



**Universidade de
Aveiro
2014**

Departamento de Biologia

**Romine Cleidy
Pereira Semedo**

**Tuberculose: Diagnóstico e Prevalência no
Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de
Aveiro
2014

Departamento de Biologia

**Romine Cleidy
Pereira Semedo**

**Tuberculose: Diagnóstico e Prevalência no Centro
Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação do Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Hospital Infante D. Pedro, Aveiro.

Dedico este trabalho à minha mãe e às minhas irmãs e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização do mesmo.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira
Investigadora de Pós Doutoramento, Centro de Neurociências e Biologia Celular
– Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Sónia Alexandre Leite Velho Mendo
Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro

Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira
Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga,
E.P.E.- Hospital Infante D. Pedro, Aveiro

Agradecimentos

É com muita satisfação que, agradeço a oportunidade concedida pelo Dr. Elmano Ramalheira de realizar este estágio no laboratório de microbiologia do CHBV. Na qualidade do meu co-orientador agradeço imenso pelo seu espírito crítico e esclarecimentos que contribuíram significativamente para que este estudo fosse concretizado com sucesso.

Também gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Sónia Mendo, pela disponibilidade e pelo apoio concedido durante a realização deste trabalho.

Tenho uma dívida de gratidão para com os funcionários do Serviço de Patologia Clínica do CHBV, pela partilha de conhecimentos, atenção, paciência e carinho que tiveram comigo durante todo o período de estágio, em especial a Dra. Luísa Almeida, com quem muito aprendi ao longo deste tempo e a Dra. Raquel Diaz e também a minha colega Andreia Lages. Agradeço também ao Dr. Cerveira e ao Dr. Abel que muito contribuíram para o levantamento de dados.

À minha mãe, Maria Da Luz, pelo amor, carinho, incentivo e apoio incondicional prestado durante todo o meu percurso académico.

Sinto uma profunda gratidão a generosidade dos meus familiares, em particular a minha tia Maria Isabel, que sempre me apoiou durante todo o meu percurso académico e a minha prima Suely Semedo pelo companheirismo e sincera amizade.

Ao Jacinto da Veiga, pelo carinho, atenção e compreensão reveladas ao longo deste percurso académico.

Agradeço a todos os meus amigos, em particular a Kathy Piedade e a Maira Etelvino pela amizade, bondade e companheirismo, que sempre tiveram ao longo do meu percurso académico.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse possível.

E por fim, mas não menos importante, a DEUS, que sempre iluminou os meus caminhos.

Palavra-chave Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, prevalência, resistência, anti bacilares, fatores de risco

Resumo A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pelas bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), que constitui um problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. A melhoria das técnicas de diagnóstico tem sido uma grande valia para uma rápida deteção e identificação das micobactérias, contribuindo para um melhor controlo epidemiológico. No entanto, continua a ser um flagelo e uma ameaça para a saúde pública devido à emergência de estirpes resistentes aos anti bacilares. Neste contexto, este trabalho teve como principal objetivo o estudo do diagnóstico laboratorial e da prevalência da tuberculose no Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV), E.P.E. Para tal realizou-se um estudo retrospectivo entre Janeiro de 2008 e Dezembro de 2013, em que foi feito o levantamento de dados no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica através do software APPOLO 2.0 e analisados com o auxílio do programa Microsoft Office Excel. Para cada caso de tuberculose foram recolhidas informações relativas ao sexo, idade, tipo da amostra, serviço requisitante, ao perfil de suscetibilidade do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a existência de coinfeção com VIH, assim como os outros fatores de risco relacionados com a TB.

Ao longo dos últimos seis anos de estudo assistiu-se a uma oscilação da prevalência de tuberculose no CHBV, tendo-se registado um decréscimo em 2010 em relação a 2008, um ligeiro aumento em 2011, seguido de uma redução em 2012 e, novamente, registou-se um aumento da prevalência em 2013. Ao analisar os fatores de risco, constatou que deve-se dar especial atenção, a dependência de tabaco e álcool e a presença de diabetes mellitus, pois para além dos estudos feitos pelo CDC, neste estudo confirmou-se que são os fatores de risco mais relacionados em doentes com tuberculose ativa. Verificou-se que a maior parte dos isolados do complexo *Micobacterium Tuberculosis* apresentaram resistências à streptomina e isoniazida. Estes dados mostram que ainda há muito para intervir com finalidade de erradicar a doença nesta população e o reconhecimento precoce da doença e a adoção de medidas eficazes de proteção são fundamentais.

Este trabalho possui informações epidemiológicas importantes, uma vez que permite ao clínico ter uma abordagem terapêutica mais adequada à população abrangida pelo CHBV.

Keywords

Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, prevalence, resistance, anti bacillary, risk factors

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) which is a public health problem, affecting millions of people. The improvement of diagnostic techniques has been a great advantage for a quick detection and identification of *mycobacteria*, allowing a better epidemiological control. However, tuberculosis still a huge threat to public health due to the emergence of resistant strains to anti bacillus. This work had as main purpose to study laboratory diagnosis and the prevalence of tuberculosis in Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV). For that it has been conducted a retrospective study between January 2008 and December 2013, where data was collected in the laboratory of Microbiology of the Clinical Pathology Service using APPOLO 2.0 software and statistically analyzed with the Excell. For each case of tuberculosis were collected information on gender, age, type of sample, service, the profile of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* and the existence of HIV infection, as well as other risk factors related to TB.

Over the past six years the prevalence of tuberculosis in CHBV was subject of some oscillation. It was observed a decrease in 2010 when compared to 2008, a slight increase in 2011 followed by another decrease in 2012 and, again, there was an increased prevalence in 2013.

To analyze the risk factors, it was found that should be given special attention, dependence on tobacco and alcohol and the presence of diabetes mellitus, because in addition to the studies by the CDC, this study confirmed that the risk factors are more related in patients with active tuberculosis. It was found that most of the isolates showed MTC resistance to isoniazid and streptomycin. These data show that there is still much to intervene with the purpose of eradicating the disease in this population and the early recognition of the disease and the adoption of effective protection measures are essential. This work has important epidemiological information, since it allows the clinician to have a better and suitable therapeutic approach in the treatment of the population covered by CHBV.

*A única maneira de realizar um grande
trabalho é Amar o que fazes.*

“Steve Jobs”

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enquadramento	2
1.2. Características do género <i>Mycobacterium</i>	3
1.3. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.4. Patogénese	6
1.5. Modo de transmissão	7
1.6. Fatores de risco	7
1.7. Manifestações clínicas	8
1.7.1. Tuberculose Pulmonar	9
1.7.2. Tuberculose Extrapulmonar	10
1.7.2.1. Tuberculose nos gânglios linfáticos (linfadenite tuberculosa)	10
1.7.2.2. Tuberculose pleural	10
1.7.2.3. Tuberculose das vias respiratórias superiores	10
1.7.2.4. Tuberculose geniturinária.....	11
1.7.2.5. Tuberculose genital	11
1.7.2.6. Tuberculose óssea	11
1.7.2.7. Meningite tuberculosa.....	12
1.7.2.8. Tuberculose gastrointestinal.....	12
1.7.2.9. Tuberculose pericárdica	12
1.7.2.10. Tuberculose miliar ou disseminada.....	13
1.8. Medidas de Prevenção e Controlo da Tuberculose.....	13
1.9. Tratamento	14
1.9.1. Agentes anti bacilares de 1. ^a linha.....	17
1.9.1.1. Rifampicina (RIF)	17
1.9.1.2. Isoniazida (INH).....	17

1.9.1.3.	Etambutol (EMB).....	18
1.9.1.4.	Pirazinamida (PZA).....	19
1.9.1.5.	Estreptomicina (STR).....	19
1.9.2.	Agentes anti bacilares de 2. ^a linha.....	19
1.9.3.	Classificação das resistências	21
1.10.	Dados epidemiológicos	22
1.10.1.	No Mundo.....	22
1.10.2.	Em Portugal	23
1.10.2.1.	Legislação em Vigor.....	25
1.10.3.	Em Cabo Verde	26
2.	OBJETIVOS DO ESTUDO	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1.	Diagnóstico laboratorial.....	30
3.1.1.	Colheita e transporte das amostras	31
3.1.2.	Tratamento das amostras	34
3.1.3.	Exame mico bacteriológico direto (Baciloscopia).....	35
3.1.4.	Exame mico bacteriológico cultural	37
3.1.4.1	Meio de cultura sólido - <i>Lowenstein-Jensen</i>	37
3.1.4.2	Meio de cultura sólido - Gelose de chocolate.....	38
3.1.4.3	Meio de cultura líquido – BacT/ALERT 3D	39
3.1.4.4	Meio de cultura líquido – VersaTREK.....	40
3.1.5.	Biologia molecular – PCR em tempo real	40
3.1.6.	Testes de suscetibilidade aos anti bacilares (TSA).....	42
4.	ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	45
4.1.	Evolução dos casos de tuberculose	49
4.1.1.	Fatores de risco presentes nos doentes diagnosticados com TB	51

4.2.	Prevalência de MTC por sexo e idade	54
4.3.	Prevalência de MTC por produtos biológicos	55
4.4.	Prevalência de MTC por serviço	57
4.5.	Prevalência de resistências aos anti bacilares	58
5.	CONCLUSÃO	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
Anexo I:	Procedimentos	75
A.	MYCOPREP-Descontaminação/homogeneização	77
B.	Preparação dos anti bacilares.....	79
C.	Coloração de <i>Ziehl - Neelsen</i>	80
Anexo II:	Ficha de identificação	81

Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática da parede celular do <i>M. tuberculosis</i> (adaptado de (Abdallah et al., 2007)).....	4
Figura 2. Imagem do bacilo de Koch (<i>M. tuberculosis</i>) em microscopia electrónica de varrimento (SEM) (adaptado de (Microbial Sciences Initiative, 2012)).	5
Figura 3. Representação esquemática da transmissão da tuberculose pulmonar (Lumb et al., 2013).	7
Figura 4. Representação esquemática da taxa de novos casos de tuberculose por 100 mil habitantes, por distrito, em Portugal, em 2012 (Adaptado de (Duarte and Diniz, 2013)).....	24
Figura 5. Tuberculose - Incidência, Prevalência e Mortalidade (por 100.000 habitantes) - Cabo Verde 2008 – 2012	28
Figura 6. Um paciente a tossir numa camara isolada.	32
Figura 7. As diferentes formas de amostras de expetoração.	32
Figura 8. Bacilos do complexo <i>M. tuberculosis</i> a vermelho, após a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).	36
Figura 9. Aspeto das colónias de micobactérias em meio de <i>Lowenstein-Jensen</i> , obtida no laboratório de microbiologia do CHBV E.P.E.	38
Figura 10. Representação esquemática do procedimento para cultura de micobactérias no aparelho BacT/ALERT 3D (Imagem tirada do CHBV E.P.E.).	39
Figura 11. Número de casos negativos e positivos de isolados de MTC.	48
Figura 12. Evolução da proporção de casos de tuberculose, no período de 2008 a 2013.	50
Figura 13. Taxa de incidência dos casos de TB em Portugal, no período de 2002 a 2012 (adaptado de (Macedo et al., 2013)).	51
Figura 14. Fatores de risco presentes nos doentes diagnosticados com TB no CHBV, no período de 2008 a 2013.	52
Figura 15. Proporção de casos de infeção VIH nos doentes com TB, no período de 2008 a 2013.	54
Figura 16. Número de casos de tuberculose por idade e género, no período de 2008 a 2013.	55
Figura 17. Número de casos de tuberculose por tipo de produto biológico, no período de 2008 a 2013.	56

Figura 18. Distribuição do número de pedidos por serviço requisitante, no período de 2008 a 2013.	58
Figura 19. Percentagens de suscetibilidade dos isolados de MTC aos anti bacilares nos doentes com tuberculose, no período de 2008 a 2013.	59
Figura 20. Evolução da prevalência de resistências, no período de 2008 a 2013.	60
Figura 21. Prevalência da resistência dos isolados de MTC aos anti bacilares testados, no período de 2008 a 2013.	60
Figura 22. Prevalência da monorresistência e multirresistência aos anti bacilares.	61
Figura 23. Perfis de suscetibilidade dos isolados MTC de todos os doentes, no período de 2008 a 2013.	62
Figura 24. Representação esquemática do procedimento de baciloscopia (Lumb <i>et al.</i> , 2013)...	80

Índice de tabelas

Tabela 1. Representação dos anti bacilares de 2ª linha (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Perri, Di and Bonora, 2004; Santos, 2012).....	20
Tabela 2. Componentes do sistema realcycler MTC.....	41
Tabela 3. Fases da amplificação do sistema realcycler MTC.....	42
Tabela 4. Procedimento: Antibiograma com as duas concentrações de isoniazida, etambutol e estreptomicina.....	43
Tabela 5. Resumo do número de doentes que deram entrada no Hospital Infante D. Pedro/CHBV E.P.E., para pesquisa de MTC, no período de 6 anos.	49
Tabela 6. Resumo do número de doentes com isolados de MTC que deram entrada no Hospital Infante D. Pedro/CHBV E.P.E. no período de 6 anos.	49

ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Koch
CDC	Do inglês “ <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ” – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CHBV	Centro Hospitalar do Baixo Vouga
DGS	Direção Geral da Saúde
DOT	Do inglês “ <i>Directly Observed Treatment</i> ” - Toma Observada Diretamente
EMB	Etambutol
HIP	Hospital Infante D. Pedro
INH	Isoniazida
TB-MR	Tuberculose Multiresistente
Mt	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	do inglês “ <i>Mycobacterium Tuberculosis Complex</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PNT	Plano Nacional de Controlo da Tuberculose
PNLCT	Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
SVIG - TB	Sistema de Vigilância da Tuberculose
TB	Tuberculose
TSA	Teste de sensibilidade aos anti bacilares
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
VIH	Vírus de Imunodeficiência Humana
ZN	<i>Zielh-Neelsen</i>

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, curável e evitável e permanece como um importante problema de Saúde Pública, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma emergência mundial (Duarte and Diniz, 2013).

Apesar do microrganismo responsável pela tuberculose ser conhecido há muito tempo, o *Mycobacterium tuberculosis* continua sendo um dos mais bem-sucedidos patógenos humanos e como o segundo agente infeccioso causador de morte no mundo e a principal causa de morte em pessoas com a VIH/SIDA (Calderon *et al.*, 2013; Duarte and Diniz, 2013; Krishnan, Robertson and Thwaites, 2010).

O *M. tuberculosis* é um patógeno humano capaz de infetar um indivíduo durante anos sem apresentar manifestações clínicas e reaparecer apenas quando a imunidade do paciente for comprometida (Huynh, Joshi and Brown, 2011).

Um rápido diagnóstico de pacientes com tuberculose é um fator considerado determinante para o controlo da doença, o que torna mais fácil a realização de exames especialmente nos países de baixo rendimento (Machado *et al.*, 2014).

A existência de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* que apresentam resistências aos vários anti bacilares representam um importante desafio para o controlo da doença em todo mundo e é um aspeto que precisa ser combatido de forma a reduzir o número destes casos (Lemos and Matos, 2013). De forma a reduzir a tuberculose, é importante que cada região adote medidas de controlo da tuberculose e para tal é essencial realizar estudos que reflitam a situação epidemiológica da mesma (Macedo *et al.*, 2012).

1.1. Enquadramento

O presente estudo foi realizado na secção de microbiologia do serviço de Patologia Clínica, do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV), E.P.E. (antigo Hospital Infante D. Pedro (HIP)).

Em 2 de Março de 2011, o Hospital Infante D. Pedro (HIP) passou a Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE e engloba as unidades hospitalares do Hospital Infante D. Pedro EPE, Hospital Distrital de Águeda e Hospital Visconde de Salreu (Centro Hospitalar Baixo Vouga -E.P.E., 2013).

Segundo o regulamento interno, o CHBV tem como missão prestar, em tempo útil e com um elevado nível de qualidade, efetividade, eficiência e custos socialmente comportáveis, cuidados de saúde diferenciados, articulando-se com outros Serviços de Saúde e Sociais da Comunidade que serve, bem como com a Rede de Cuidados de Saúde Primários e com a Rede Nacional de Cuidados Continuados Integrados, apostando na motivação e satisfação dos seus Profissionais e Colaboradores (Centro Hospitalar Baixo Vouga -E.P.E., 2013).

O serviço de Patologia Clínica, parte integrante do CHBV, é um dos muitos serviços deste hospital que dá apoio para atingir os objetivos acima supracitados. Este serviço é composto pelos seguintes setores, bioquímica, imunoquímica, hematologia e coagulação e ainda microbiologia. Este serviço funciona 24 horas por dia e dá apoio a consulta externa, cirurgia de ambulatório, hospital de dia, bloco operatório e ao serviço de urgência.

Na secção de microbiologia são realizados diversos exames com objetivo de isolar e identificar os agentes infecciosos e avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana a fim de orientar o clínico no diagnóstico, tratamento e monitorização da doença.

O funcionamento deste sector é assegurado por patologistas clínicos, técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores de saúde, assistentes técnicos e uma administrativa.

Realizou-se um estudo retrospectivo entre Janeiro de 2008 e Dezembro de 2013, para tal foi feito o levantamento de dados no sistema informático APPOLO 2.0. Para cada

caso de tuberculose foram recolhidas informações relativas ao sexo, a idade, ao tipo da amostra, ao serviço requisitante, ao perfil de suscetibilidade do microrganismo e a presença de alguns fatores de risco relevantes para tuberculose, assim como a coinfeção com VIH, também estes dados foram analisados durante o período de estágio. Para o tratamento estatístico dos dados, procedeu-se a utilização do programa informático Microsoft Office Excel.

1.2. Características do género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* pertence à classe *Actinomycetes*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*. Atualmente são conhecidas mais de 150 espécies de *Mycobacterium* e muitas delas são patogénicas, como por exemplo os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Machado *et al.*, 2014). Estas espécies estão relacionadas com um largo espectro de infeções, quer no homem, quer nos animais, podendo causar desde uma infeção bem localizada a uma infeção disseminada. Tendo em conta a doença associada e a epidemiologia, as micobactérias encontram-se divididas em dois grandes grupos o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e *nontuberculous mycobacteria* (NTM) (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah, 2008).

Os membros deste género são finos, imóveis e em forma de bastonetes com dimensões de 0.2 a 0.4 x 2 a 10 µm. A parede celular das micobactérias é particularmente rica em lípidos e é constituída por três diferentes estruturas ligadas covalentemente conforme se pode observar pela análise da Figura 1: peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. A camada de peptidoglicano é um polímero que confere forma à célula e contribui com cerca de 50% do peso da parede celular. Os ácidos micólicos formam uma segunda barreira hidrofóbica com baixa fluidez chamada micomenbrana e são os principais responsáveis pela propriedade álcool-ácido resistente das micobactérias. A camada externa que é designada de cápsula contém polissacarídeos (glucano e arabinogalactano), sendo a parte externa da micomenbrana constituída por vários lípidos livres, que intercalam com os ácidos micólicos. Estas estruturas integrantes da parede celular são essenciais para a interação do microrganismo com o hospedeiro (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah, 2008; Brennan, 2003).

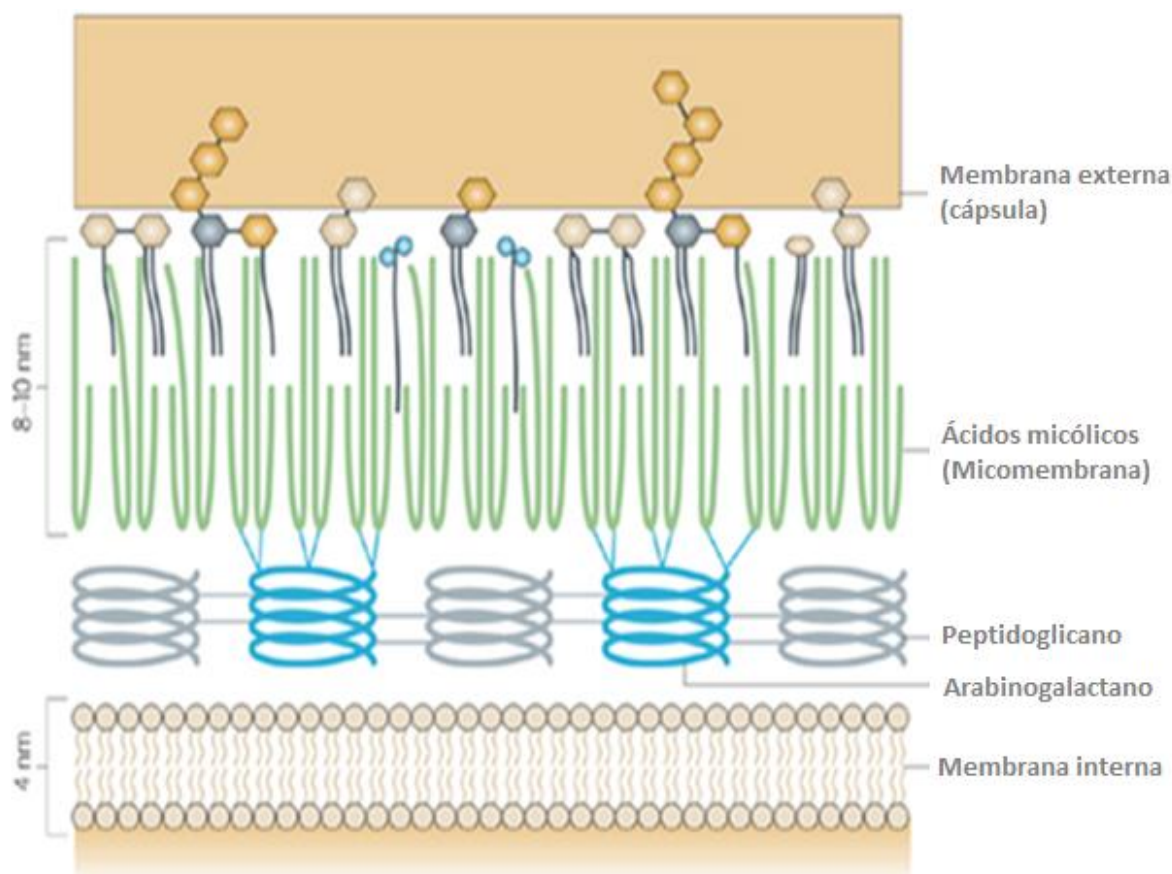


Figura 1. Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis* (adaptado de (Abdallah *et al.*, 2007))

1.3. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O MTC é composto por sete espécies do qual fazem parte *Mycobacterium pinnipedi*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium tuberculosis*. Destas espécies destacam-se *M. tuberculosis* e *M. bovis*, por serem as que mais doença tem causado nos seres humanos (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Murray *et al.*, 2007). Estes microrganismos apresentam um crescimento lento e as colónias não produzem pigmento (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007).

O *M. tuberculosis* é o microrganismo mais comum e importante pertencente ao MTC. É uma bactéria aeróbica delgada, em forma de bastonete, não formadora de esporos

e que mede 0.5 μm por 30 μm , como se pode observar pela análise da Figura 2 (Fauci *et al.*, 2008).



Figura 2. Imagem do bacilo de Koch (*M. tuberculosis*) em microscopia electrónica de varrimento (SEM) (adaptado de (*Microbial Sciences Initiative*, 2012)).

M. tuberculosis é uma bactéria prototrófica e metabolicamente flexível. Possui um único cromossoma circular, composto por 4.411.529 bp com aproximadamente 3900 genes que codificam proteínas (Velayati and Farnia, 2012).

No entanto, o NTM inclui todas as outras espécies de micobactérias que não fazem parte do MTC, estes microrganismos podem ter crescimento lento ou rápido. Atualmente são conhecidas 140 espécies, consideradas não patogénicas e ambientais por se encontrar tanto na água como no solo. Podem colonizar indivíduos saudáveis na pele, no trato respiratório e gastrointestinal (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Murray *et al.*, 2007).

A distinção rápida e precisa entre as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e *nontuberculous mycobacteria* é essencial, uma vez, que permite evitar a propagação da infeção, a realização inadequada de testes de sensibilidade aos anti bacilares sem a identificação da espécie e ainda permite a implementação de uma terapia adequada (Machado *et al.*, 2014).

1.4. Patogénese

A tuberculose humana constitui uma das principais causas de morte entre as doenças infecciosas, trata-se de uma doença constituída por fases. A primeira fase inicia-se com a inalação de aerossóis contaminados por micobactérias (bacilos de Koch), que serão fagocitados pelos macrófagos. As estruturas da parede celular das micobactérias facilitam a sua sobrevivência no interior dos macrófagos e ao sobreviverem, crescem e multiplicam-se a cada 24 horas. De seguida são libertados e fagocitados por novos macrófagos em diferentes partes do organismo, propagando-se através do sistema linfático e/ou circulatório (Fauci *et al.*, 2008; Huynh, Joshi and Brown, 2011; Raviglione, 2010; World Health Organization, 2013).

Após um intervalo de quatro a seis semanas o organismo desenvolve imunidade específica para o bacilo. Os linfócitos migram para a zona infetada e ativam os macrófagos. Devido a contínua infiltração celular, o centro da massa celular ou granuloma torna-se caseoso e necrótico. Esta fase em que os bacilos mantêm-se viáveis e não há manifestação da doença é designada de tuberculose latente. Após a infeção, cerca de 10% dos indivíduos infetados desenvolvem sintomas característicos de tuberculose primária ativa ou progressiva, nomeadamente tosse, letargia e perda de peso. Na reativação da tuberculose latente, que podem ocorrer alguns anos após a infeção inicial, o granuloma torna-se grande e o material caseoso liquefaz-se e sem irrigação sanguínea diminui a capacidade do sistema imunitário combater a infeção. Os bacilos multiplicam-se dentro da cavidade liquefeita e em caso de rutura, com a entrada do ar, o fluido é expulso na forma de aerossol infeccioso sempre que o paciente tosse (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Huynh, Joshi and Brown, 2011; Krishnan, Robertson and Thwaites, 2010; Raviglione, 2010).

A doença pode tornar-se sistémica, afetando para além do pulmão o trato geniturinário, os gânglios linfáticos, o sistema nervoso central (meninges), o peritoneu, o pericárdio, a laringe, o osso e a articulação (artrite e osteomielite). Os indivíduos infetados com Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) são propensos a desenvolver uma doença primária, rapidamente progressiva, em vez de uma infeção subclínica (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Munawwar and Singh, 2012).

1.5. Modo de transmissão

Normalmente, a transmissão ocorre por disseminação aérea de gotículas de saliva, contendo bacilos álcool ácido resistentes produzidas por um doente com tuberculose ativa. Isto pode acontecer aquando o doente espirra, tosse ou canta e pode infectar mais de 10-15 pessoas através do contacto próximo ao longo de um ano Figura 3. A inalação de um único microrganismo viável pode levar a infeção, no entanto é necessária uma grande proximidade para aquisição da infeção. A presença de micobactérias na tosse seca é um fator importante na transmissão através de aerossóis, pois estes microrganismos são resistentes à desidratação (American Thoracic Society, 2000; Fauci *et al.*, 2008; Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; World Health Organization, 2013).

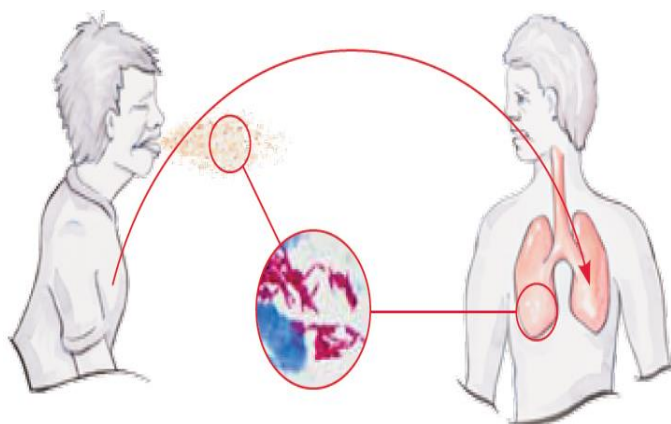


Figura 3. Representação esquemática da transmissão da tuberculose pulmonar (Lumb *et al.*, 2013).

1.6. Fatores de risco

A transmissão da tuberculose de uma pessoa para a outra requer uma fonte de infeção, um microrganismo virulento, um hospedeiro vulnerável e ainda condições ambientais favoráveis. No entanto vários fatores estão implicados no aumento do risco da transmissão, nomeadamente o número de microrganismos expelidos no ar, a concentração de microrganismos no ar determinado pelo volume do espaço e a sua ventilação, o tempo de exposição ao ar contaminado e presumivelmente o estado do sistema imunitário do

indivíduo exposto (American Thoracic Society, 2000; Murray *et al.*, 2007; Palomino, Leão and Ritacco, 2007). A resposta imune mediada por células do hospedeiro limita a multiplicação e a disseminação do *M. tuberculosis*, contudo indivíduos com infecção latente têm um risco de 10% de durante a sua vida para desenvolverem a doença (Murray *et al.*, 2007).

O *M. tuberculosis* é transportado por aerossóis (núcleos de gotículas), gerados quando pacientes infetados com tuberculose pulmonar tosse. A infecção latente ocorre quando uma pessoa suscetível inspira os núcleos de gotículas. Estes núcleos são pequenos o suficiente para alcançar os alvéolos dentro dos pulmões, onde os microrganismos se multiplicam (Murray *et al.*, 2007). Os pacientes infetados também podem produzir partículas maiores com numerosos bacilos, no entanto estas partículas não são veículos eficazes para a transmissão da infecção, porque não permanecem no ar por muito tempo e se inalados, não alcançam os alvéolos (American Thoracic Society, 2000).

Qualquer pessoa é suscetível a esta doença, mas existem grupos mais vulneráveis, nomeadamente, indivíduos com infecção VIH/SIDA, emigrantes, profissionais de saúde e ainda reclusos (World Health Organization, 2013). No entanto, os indivíduos com tuberculose pulmonar e com cavitações pulmonares têm mais probabilidade de transmitir o *M. tuberculosis* e constituem um dos mais importantes fatores de risco de transmissão (American Thoracic Society, 2000; Munawwar and Singh, 2012; Raviglione, 2010).

1.7. Manifestações clínicas

A tuberculose é uma doença que afeta normalmente os pulmões, embora os outros órgãos possam ser atingidos em até 33% dos casos (Fauci *et al.*, 2008). Os doentes infetados com *M. tuberculosis* podem ser assintomáticos ou sintomáticos. No entanto, podem apresentar sintomas sistémicos, sinais e sintomas pulmonares, sinais e sintomas relacionados com o envolvimento de um outro órgão (por exemplo, rim), ou uma combinação destes dois (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007).

A tuberculose é classificada em pulmonar e extrapulmonar (Fauci *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, um doente com tuberculose pulmonar e

extrapulmonar, deve ser classificado como um caso de tuberculose pulmonar (World Health Organization, 2013).

1.7.1. Tuberculose Pulmonar

A tuberculose pulmonar envolve o parênquima pulmonar ou a árvore traqueobrônquica e pode ser classificada em primária ou pós-primária (secundária) (Fauci *et al.*, 2008; World Health Organization, 2013).

A doença primária inicia-se pouco depois da contaminação pelo bacilo da tuberculose. A lesão é periférica e habitualmente a região média e inferior do pulmão é mais afetada devido ao facto de receber a maior quantidade do ar inspirado. A lesão inicial aumenta de tamanho podendo evoluir de diferentes modos, conforme a resposta imunitária do indivíduo. Cerca de 66% dos casos de derrame pleural resultam da penetração de bacilos no espaço pleural a partir de um foco subpleural adjacente. Nos casos graves, o local primário aumenta rapidamente, a sua parte central sofre necrose, e verifica-se o desenvolvimento de cavitação, que também é conhecida como tuberculose primária progressiva (Fauci *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2007).

A doença pós-primária, também designada de tuberculose do tipo adulto ou secundária, resulta da reativação endógena de infeção latente e localiza-se habitualmente, nos segmentos apicais e posteriores dos lobos superiores, onde a tensão média de oxigénio é consideravelmente mais alta do que nas regiões inferiores, favorecendo o crescimento das micobactérias. Nesta fase os principais sinais e sintomas são nomeadamente a anorexia, mal-estar geral, fraqueza, perda de peso, febre e sudorese noturna. E por fim aparece a tosse, primeiramente improdutiva e mais tarde é acompanhada de expectoração purulenta, e por vezes com estrias de sangue. Além destes, nos pacientes com lesões parenquimatosas subpleurais também podem surgir algumas vezes, hemoptise e dor torácica pleurítica. Numa fase mais crítica pode causar dispneia e, em casos raros, síndrome de angustia respiratória do adulto (SARA) (Fauci *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2007; Noertjojo *et al.*, 2002).

1.7.2. Tuberculose Extrapulmonar

A tuberculose extrapulmonar envolve todos os órgãos, com a exceção do pulmão. Normalmente, os locais/orgãos extrapulmonares mais atingidos são os gânglios linfáticos, a pleura, o trato geniturinário, os ossos e as articulações, as meninges, o peritoneu e o pericárdio (Fauci *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2007; Noertjojo *et al.*, 2002; World Health Organization, 2013).

1.7.2.1. Tuberculose nos gânglios linfáticos (linfadenite tuberculosa)

A tuberculose nos gânglios linfáticos é causada principalmente pelo *M. bovis* e *M. tuberculosis*, sendo atualmente provocada em grande parte pelo *M. tuberculosis* e localiza-se mais comumente em locais supraclaviculares e cervicais posteriores. Na fase inicial da doença os gânglios linfáticos são distintos e indolores, podem estar inflamados e apresentar um trajeto fistuloso drenando material caseoso. É particularmente frequente em doentes infectados pelo VIH (Fauci *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2007).

1.7.2.2. Tuberculose pleural

A tuberculose pleural é comum na tuberculose primária. Pode resultar da disseminação contínua da inflamação parenquimatosa ou, da penetração de bacilos no espaço pleural, que acontece muitas vezes na pleurite que acompanha a doença pós-primária. O derrame pleural causa sintomas como febre, dor torácica pleurítica, dispneia e suores nocturnos. O líquido pleural apresenta uma “cor-de-palha” e, pode ser hemorrágico ou ocorrer empiema pleural devido a rutura de uma cavidade, com vazamento de grande número de microrganismo no espaço pleural (Fauci *et al.*, 2008; Houston and Macallan, 2014).

1.7.2.3. Tuberculose das vias respiratórias superiores

Resulta frequentemente de uma complicação da tuberculose pulmonar cavitária avançada, e pode afetar a laringe, faringe e epiglote, apresentando os seguintes sintomas: tosse reprodutiva crónica, rouquidão, disfonia e disfagia (Fauci *et al.*, 2008).

1.7.2.4. Tuberculose geniturinária

A tuberculose geniturinária pode afetar qualquer parte do trato geniturinário, os pacientes podem ser assintomáticos, sendo descoberta após o desenvolvimento de lesões destrutivas graves dos rins ou sintomáticos apresentando disúria, noctúria, hematúria e dor no flanco ou abdominal (Fauci *et al.*, 2008). A TB renal é geralmente unilateral e raramente causa insuficiência renal, a exceção da nefrite intersticial, esta constitui uma forma de tuberculose menos frequente, que pode afetar ambos os rins (Houston and Macallan, 2014).

1.7.2.5. Tuberculose genital

A tuberculose genital é diagnosticada mais frequentemente em mulheres do que nos homens, podendo provocar infertilidade, dor pélvica e ainda anormalidades menstruais. No sexo masculino, afeta essencialmente o epidídimo, produzindo uma massa ligeiramente hipersensível que pode drenar para o exterior através de um trajeto fistuloso (Fauci *et al.*, 2008).

1.7.2.6. Tuberculose óssea

Também designada de tuberculose osteoarticular, pode afetar qualquer osso ou articulação, sendo os mais afetados, a coluna vertebral (mal de Pott ou espondilite tuberculosa, representando 40% dos casos), a bacia (13% dos casos) e os joelhos (10% dos casos). A sua patogenia está relacionada com a reativação de focos hematogénicos ou disseminação a partir de gânglios linfáticos paravertebrais adjacentes. O mal de Pott afeta frequentemente dois ou mais corpos vertebrais adjacentes, podendo provocar paraplegia devido a lesão comprimindo a medula espinhal. Nas crianças, a coluna torácica superior constitui o local mais comum de tuberculose da coluna vertebral e nos adultos são habitualmente afetados as vertebbras torácicas inferiores e as lombares superiores. Os principais sintomas da tuberculose óssea são a dor e a tumefação (Fauci *et al.*, 2008; Houston and Macallan, 2014).

1.7.2.7. Meningite tuberculosa

A meningite tuberculosa resulta da disseminação hematogénica da doença pulmonar primária ou pós-primária. Ocorre com mais frequência em crianças, mas também é observada em adultos, principalmente nos infetados pelo VIH. Esta manifestação clínica é responsável por cerca de 10% dos casos TB extrapulmonar e cerca de 1% de todos os casos de TB. Numa fase inicial é assintomática enquanto que numa fase mais avançada da doença podem ocorrer sequelas neurológicas (Fauci *et al.*, 2008; Kelekçi *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2014).

1.7.2.8. Tuberculose gastrointestinal

Este tipo de manifestação ocorre raramente. Quando acontece é devido a vários processos, nomeadamente: deglutição de expectoração com disseminação direta, disseminação sanguínea ou ingestão de leite de vaca com tuberculose bovina, afetando em maior parte o íleo terminal e o cego. Os sintomas consistem em dor abdominal, tumefação, obstrução, hematoquécia, massa palpável no abdómen, febre, perda de peso, anorexia e sudorese noturna (Fauci *et al.*, 2008; Houston and Macallan, 2014).

1.7.2.9. Tuberculose pericárdica

A tuberculose pericárdica, também é designada por pericardite tuberculosa. Ocorre devido à progressão direta de um foco primário no interior do pericárdio, a reativação de um foco latente ou devido a rutura de um gânglio linfático. Tem como principais sintomas, dispneia, febre, dor retroesternal surda e atrito pericárdico, por fim, ocorre derrame em muitos casos, levando ao aparecimento de sinais e sintomas cardiovasculares (Fauci *et al.*, 2008).

1.7.2.10. Tuberculose miliar ou disseminada

Deve-se à disseminação sanguínea dos bacilos da tuberculose, provocando granulomas amarelados de 1 a 2 mm de diâmetro. Os principais sintomas consistem em febre, sudorese noturna, anorexia, fraqueza e perda de peso. Além destes, os pacientes apresentam também tosse e outros sintomas respiratórios, devido ao comprometimento pulmonar e sintomas abdominais (Fauci *et al.*, 2008; World Health Organization, 2012).

1.8. Medidas de Prevenção e Controlo da Tuberculose

Um dos principais métodos de prevenção bastante eficaz, principalmente contra a meningite tuberculosa e doença disseminada, é a vacinação com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Trata-se de uma vacina viva atenuada, derivada do *M. bovis*, que produz uma infecção micobacteriana suave, por vezes sistémica que dura várias semanas, com a finalidade de promover proteção contra doenças provocadas por *M. tuberculosis*. Esta vacina é recomendada aos recém-nascidos em todo mundo, desde que possuem um peso igual ou superior a 2 Kg. Estudos evidenciam que esta vacina reduz significativamente o risco da tuberculose em 50% (Colditz *et al.*, 1994; Reyn, von and Vuola, 2002). Além deste, são recomendados a realização do Teste Cutâneo de Tuberculina (TST) ou “*Interferon Gamma Release Assays*” (IGRA) em doentes com VIH ou suspeitas de TB e também para pessoas que estão em risco substancial de exposição ao *M. tuberculosis* (Pascopella *et al.*, 2014). A co-infecção VIH/TB tem sido cada vez mais frequente e continuará a ser um problema, especialmente em países africanos onde a taxa de infecção por VIH é alta. Para continuar a luta contra a doença e alcançar os objetivos definidos, será um esforço coordenado tanto em doentes infetados com TB, como em doentes infectados com VIH (Landscape, 2012).

As principais medidas de controlo da tuberculose devem basear-se numa avaliação cuidadosa dos riscos para a transmissão da doença. Os objectivos dos programas de controlo da infecção consistem na identificação precoce da doença, no isolamento e no

tratamento precoce dos pacientes infectados ou com suspeitas de tuberculose (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

A tuberculose continua a ser a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas, logo a seguir ao VIH, desta forma o controlo desta epidemia constitui um dos Objetivos de Desenvolvimento do Milénio (ODM) (Macedo *et al.*, 2013; United Nations, 2013). A fim de alcançar os ODM, a OMS está a trabalhar no combate à TB através da Estratégia Stop TB. Esta metodologia passa pela expansão e o aperfeiçoamento da estratégia da Toma Observada Direta (do inglês DOTS – Directly Observed Treatment Short-Course) de elevada qualidade, lidar com a TB/VIH, TB-MR e as necessidades das populações pobres e vulneráveis, envolve todos os prestadores de cuidados de saúde, contar com o apoio das pessoas com TB e as comunidades através de parcerias e permite a promoção da investigação (Macedo *et al.*, 2013). O controlo da tuberculose tem vindo a melhorar após a implementação da Estratégia Stop TB e do Plano Global do Stop TB (Landscape, 2012).

A Parceria Stop TB alinha-se com os ODM para reduzir a TB até 2015, tendo como objetivos específicos (Macedo *et al.*, 2013):

- Permitir o acesso aos cuidados de alta qualidade para todos os doentes com TB;
- Reduzir o sofrimento humano e a carga socioeconómica associada à doença;
- Proteger as populações vulneráveis da TB, TB/VIH e TB-MR;
- Contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas e permitir a sua utilização atempada e eficaz;
- Proteger e promover os direitos humanos aos cuidados de TB, prevenção e controle.

1.9. Tratamento

O início do tratamento da tuberculose pulmonar com medicamentos foi marcado pela descoberta da estreptomicina em 1944, por Waksman. Os medicamentos para cura da tuberculose foram designados de Tuberculostáticos ou Quimioterápicos anti bacilares.

Destes foram utilizados tiosemicarbazona, ácido p-aminosalicílico (PAS), a penicilina, a isoniazida, a pirazinamida, a etionamida, a cicloserina, a kanamicina, a capriomicina e a rifampicina, tendo-se conseguido resultados terapêuticos excepcionais que levaram a pensar que a tuberculose rapidamente estaria dominada e passaria a fazer parte do grupo de doenças infecciosas insignificantes (Santos, 2010). Em 1905, Robert Koch tinha descoberto a tuberculina, pensando ser um princípio terapêutico, mas mais tarde descobriu que se tratava de um meio de diagnóstico. Apesar das diferentes abordagens terapêuticas, a doença permaneceu incurável até 1944, altura em que Waksman descobriu a estreptomicina (SM), o primeiro agente bacilar a mostrar efetividade (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Macedo *et al.*, 2013).

Perante um tratamento correto, a tuberculose causada por estirpes sensíveis aos anti bacilares, é curável praticamente em todos os casos (Fauci *et al.*, 2008).

Os principais objetivos do tratamento da tuberculose consistem em curar o doente, minimizar o risco de morte ou invalidez e reduzir o risco da transmissão do *M. tuberculosis* para outras pessoas. Deve conter um conjunto de anti bacilares, de forma a curar a doença e diminuir a ocorrência de resistência. O tratamento inicial consiste na combinação de 4 anti bacilares. A monoterapia pode levar ao desenvolvimento de estirpes resistentes ao anti bacilar em causa (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

O tratamento para *M. tuberculosis* deve ser prolongado, porque estes microrganismos diferem na atividade metabólica, e deve incluir vários fármacos, uma vez que as mutações cromossómicas espontâneas podem originar resistências aos anti bacilares. Os principais desafios do tratamento da tuberculose são, as estirpes resistentes, redução do tempo do tratamento e a dose adequada para facilitar a adesão por parte do doente. Os anti bacilares devem possuir algumas características como uma ação rápida, ser ativos contra as estirpes resistentes e ainda ser capaz de erradicar as populações lentamente metabolizantes (Coll, 2009).

De modo a evitar o aparecimento de estirpes resistentes aos anti bacilares, a Organização Mundial de Saúde (OMS) investiu em programas universais assentes na toma de medicamentos diretamente observada (do inglês DOTS – Directly Observed Treatment Short-course), onde os pacientes são acompanhados durante o tratamento (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Os medicamentos de 1.^a linha para o tratamento da tuberculose são a rifampicina, estreptomicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida. Nos casos de multirresistência ou em casos de hepatotoxicidade grave (resultante de administração dos fármacos de 1.^a linha) utiliza-se também: p-aminosalicilato (PAS), D-cicloserina, capreomicina, aminoglicosídeos e quinolonas (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Ferreira and Sousa, 2000; Valcheva and Mokrousov, 2011).

A doença deve ser tratada em pelo menos 6 meses e em alguns casos até mais tempo. Durante as primeiras oito semanas de tratamento, a maior parte dos microrganismos são mortos, no entanto existem algumas estirpes persistentes que necessitam de um tratamento mais prolongado. Em caso do tratamento não ser continuado por um tempo suficiente, estas estirpes podem tornar-se resistentes aos anti bacilares, dificultando o tratamento (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Ferreira and Sousa, 2000).

O tratamento da tuberculose multirresistente (TB-MR) é complexo, prolongado e está associado a uma maior frequência de reações adversas. O esquema terapêutico consiste na associação de pelo menos quatro fármacos (três dos quais não devem ter sido usados anteriormente), no uso de uma fluoroquinolona (ofloxacina, levofloxacina ou moxifloxacina) e no uso de um anti bacilar injetável (estreptomicina, ampicilina, canamicina ou capreomicina), durante um período mínimo de 6 meses com supervisão de uma unidade de referência onde o paciente está a ser tratado ou numa unidade de saúde. Os anti bacilares de segunda linha devem ser adicionados a terapêutica de modo a aumentar a sensibilidade das estirpes de MTC aos anti bacilares (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Gandhi *et al.*, 2010; Lemos and Matos, 2013; Santos, 2012).

Para, o tratamento da tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) utiliza-se o mesmo regime terapêutico da TB-MR, embora pode ser necessário adicionar anti bacilares da terceira linha para atingir 4 a 6 fármacos sensíveis. O tratamento deve continuar com os restantes fármacos orais por um período mínimo de dezoito meses (Gandhi *et al.*, 2010; Lemos and Matos, 2013; Santos, 2012).

1.9.1. Agentes anti bacilares de 1.^a linha

De uma maneira geral, pode-se dizer que os agentes anti bacilares essenciais de primeira linha são os mais efetivos e constituem um componente de qualquer esquema terapêutico de curta duração. Fazem parte desta categoria, a rifampicina, isoniazida, etambutol e piramizida. Os agentes complementares de primeira linha, que são altamente efetivos e cuja toxicidade é aceitável, consistem na rifabutina, rifapentina e estreptomicina. Os agentes tuberculostáticos de segunda linha são clinicamente muito menos efetivos do que os da primeira linha e desencadeiam reações graves com maior frequência (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Fauci *et al.*, 2008; Goodman and Gilman, 2005; Valcheva and Mokrousov, 2011).

1.9.1.1. Rifampicina (RIF)

É um derivado sintético de *Streptomyces mediterranei*, é considerado o agente antituberculoso mais importante e potente.

A rifampicina possui atividade bactericida tanto intracelular como extracelular, porque inibe o gene *rpoB* produtor da subunidade β RNA polimerase dependente de DNA, bloqueando a síntese de RNA. A resistência adquirida à rifampicina resulta de mutações pontuais espontâneas que alteram a subunidade β do gene da RNA polimerase (*rpoB*) (Fauci *et al.*, 2008; Goodman and Gilman, 2005; Santos, 2012). A rifampicina exerce a sua ação bactericida no *M. tuberculosis* ao desencadear a apoptose através da ativação de *masEF*, o gene suicida (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Aroonsri *et al.*, 2008; Santos, 2012).

1.9.1.2. Isoniazida (INH)

É a hidrazida do ácido isonicotínico, uma pequena molécula hidrossolúvel, que penetra facilmente na célula. É o melhor agente antituberculoso e deve ser incluído em todos os esquemas terapêuticos exceto quando os microrganismos apresentam resistências.

A isoniazida é um agente bacteriostático contra bacilos dormentes, e bactericida contra microrganismos em multiplicação rápida tanto extracelulares quanto intracelulares. Atua inibindo a ação do ácido micólico na parede celular através de vias dependentes de oxigênio, como a reação de catalase-peroxidase e também inibe InhA, um dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) que carrega uma proteína envolvida na síntese de ácidos gordos. As estirpes resistentes a isoniazida apresentam na sua maioria, alterações de aminoácidos no gene da catalase-peroxidase (KatG) ou no promotor de um locus de dois genes, conhecido como *inhA* (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Fauci *et al.*, 2008; Goodman and Gilman, 2005; Santos, 2012; Sc and D, 2002).

A isoniazida, também produz vários compostos altamente reativos, inclusive as espécies reativas de oxigênio que atacam diversos alvos no *M. tuberculosis*. Este ataque resulta na inibição da proteína *inhA* e da síntese do ácido nucleico (Santos, 2012).

1.9.1.3. Etambutol (EMB)

É um derivado da etilenodiamina, é um composto hidrossolúvel, ativo apenas contra micobactérias. É o fármaco menos potente da primeira linha, é utilizado em combinação com INH, PZA e RIF para prevenir o aparecimento de resistências (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Fauci *et al.*, 2008; Goodman and Gilman, 2005; Santos, 2012).

O EMB é bacteriostático contra o *M. tuberculosis*. Atua inibindo a arabinosiltransferase, que medeia a polimerização da arabinose em arabinolactano na parede celular. A arabinosiltransferase, uma enzima responsável pela síntese de arabinogalactano é codificada pelo gene *embB*. A mutação neste gene é responsável pela resistência do *M. tuberculosis* ao etambutol (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Fauci *et al.*, 2008; Santos, 2012).

1.9.1.4. Pirazinamida (PZA)

É um derivado do ácido nicotínico, é um agente bactericida importante utilizado juntamente com o INH e RIF no tratamento de curta duração da tuberculose.

A PZA possui um espectro estreito de atividade antibacteriana, que essencialmente inclui-se o *M. tuberculosis*, exercendo sua ação em meio ácido. É um profármaco, sendo convertida pelo bacilo da tuberculose na forma ativa, o ácido pitrazinoico. O alvo deste composto é um gene de ácido gordo sintase (fasI) (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Fauci *et al.*, 2008; Goodman and Gilman, 2005; Santos, 2012).

1.9.1.5. Estreptomicina (STR)

É um aminoglicosídeo isolado do *Streptomyces griseus*, está disponível apenas para administração intramuscular e intravenosa. Nos EUA é tido como um agente complementar de primeira linha menos utilizado devido à sua toxicidade, pela dificuldade em obter níveis adequados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e inconveniência da sua administração parenteral. A própria Organização Mundial de Saúde recomenda a sua utilização como um fármaco complementar de primeira linha (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Goodman and Gilman, 2005; Santos, 2012).

A STR induz alterações ribossomais, o que causa má interpretação do mRNA e a inibição da síntese de proteínas. Os isolados de *M. tuberculosis* tornam-se resistentes quando os alvos da STR sofrem mutações no ribossoma (Khanna and Solanki, 2012; Santos, 2012).

1.9.2. Agentes anti bacilares de 2.^a linha

Segundo a OMS, para o tratamento da tuberculose multirresistente deve-se usar os seguintes fármacos de 2.^a linha que estão representados na Tabela 1, assim como as suas ações. Em regra estes fármacos são menos eficazes e mais tóxicos em comparação com os da primeira linha (Santos, 2012; Silva and Palomino, 2011).

Tabela 1. Representação dos anti bacilares de 2ª linha (Almeida Da Silva and Palomino, 2011; Perri, Di and Bonora, 2004; Santos, 2012).

Fármaco	Substancia ativa	Ação
Aminoglicosídeos	Kanamicina e Amicacina	Inibem a síntese das proteínas assim como a STR.
Polipéptidos	Capreomicina, Viomicina e Enviomicina	Inibem a síntese de proteínas procarióticas e possui uma atividade potente contra as formas persistente de TB.
Fluoroquinolonas	Ofloxacina, Ciprofloxacina e Gatifloxacina	Inibem as enzimas responsáveis pela manutenção de cromossomos num estado topológico apropriado, resultando na morte microbiana.
Cicloserina	D-cicloserina	Inibem a D-alanina racemase (Alr) e D-alanina, que são essenciais na síntese de peptidoglicano e posteriormente na biossíntese da parede celular.
Tionamidas	Etionamida e Protionamida	É um pró-fármaco, análogo a isoniazida, no entanto possui mais atividades do que esta.
Ácido aminosalicílico	Ácido para-aminosalicílico	É bacteriostático e específico para <i>M. tuberculosis</i> . Interfere na biossíntese do ácido fólico bacilar.
Oxazolidinonas	Linezolida	Inibe a síntese das proteínas.
Rifamicinas	Rifabutina e Rifapentina	Inibe a RNA polimerase micobacteriana. É mais ativa do que a rifampicina.

1.9.3. Classificação das resistências

As resistências aos anti bacilares resultam de mutações espontâneas e não são resultados de transferência horizontal de genes (Lemos and Matos, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, os isolados de *M. tuberculosis* podem apresentar diferentes tipos de resistências (Lemos and Matos, 2013; World Health Organization, 2013):

- Resistência natural - resulta da mutação natural, independentemente da exposição anterior a anti bacilares e diretamente proporcional ao número de bacilos mutantes;
- Resistência primária - casos de resistência em indivíduos que não foram anteriormente expostos a anti bacilares;
- Resistência adquirida - casos de resistência em que os doentes foram previamente submetidos a tratamento de tuberculose, geralmente inadequado;
- Monorresistência - resistência apenas a um anti bacilar de 1ª linha;
- Polirresistência - resistência a mais de um anti bacilar de 1ª linha, contudo sensível a isoniazida e a rifampicina;
- Multirresistência - tuberculose multirresistente (TB-MR) - resistência a pelo menos dois anti bacilares essenciais no tratamento da TB - a isoniazida e a rifampicina;
- Extensivamente resistente - tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) – Além da multirresistência, apresenta resistência a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos 3 medicamentos injetáveis de 2.ª linha, nomeadamente kapreomicina, canamicina e ampicacina) (Perdigão *et al.*, 2013).

O aparecimento da tuberculose multirresistente é muitas vezes causado por uma má implementação de medidas de controlo e gestão de casos de tuberculose. Logo, estas resistências refletem uma má qualidade dos programas de controlo e é uma consequência direta de uma terapêutica deficiente no que diz respeito ao uso dos anti bacilares (Lemos and Matos, 2013).

A tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) ocorre devido a aquisição de várias mutações nos genes associadas a resistência. Estas mutações podem interferir com o

alvo do fármaco ou causar superexpressão das enzimas que podem modificar a proteína alvo ou o fármaco (Perdigão *et al.*, 2013).

1.10. Dados epidemiológicos

1.10.1. No Mundo

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, potencialmente mortal (Fauci *et al.*, 2008). Apesar do microrganismo responsável pela tuberculose ter sido conhecido há muito tempo (24 de Março de 1882 em Berlim), anunciado pelo Robert Koch, o *M. tuberculosis* é considerado como o segundo agente infeccioso causador de morte no mundo e a principal causa de morte em doentes com infeção por VIH/SIDA. A tuberculose continua a ser um flagelo e uma ameaça constante para a saúde pública, em parte devido à emergência de estirpes resistentes aos anti bacilares (Calderon *et al.*, 2013; Duarte and Diniz, 2013; Fauci *et al.*, 2008).

Anualmente morrem entre um e dois milhões de pessoas com tuberculose (Ferreira, 2013). Segundo o relatório da OMS, estima-se que em 2012, cerca de 8,6 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,3 milhões morreram devido à mesma. No entanto a cada ano surgem 8,8 milhões de novos casos, sendo que 1,1 milhão estão infetados com VIH (Lago, 2012; World Health Organization, 2008).

Em 2010, nos Estados Unidos houve 569 mortes por TB. Tendo em conta o ano de 2000, que ocorreram 776 mortes, isto representa uma diminuição de 27% em mortes por TB (Centers for Diseases Controls and Prevention, 2013).

Em 2012, mais de 95% das mortes por TB ocorreram em países de baixo e médio rendimento, e está entre as três causas principais de morte para mulheres com idade compreendida entre os 15 e 44 anos. Cerca de 530.000 crianças ficaram doentes com TB e 74 mil morreram (World Health Organization, 2008, 2012).

A taxa de mortalidade por TB diminuiu 45% entre 1990 e 2012. O número estimado de pessoas infetadas por ano está a diminuir, embora muito lentamente, o que significa que o mundo está no caminho certo para atingir a meta proposta pelo

“Millennium Development Goal” para reverter a disseminação da TB até 2015 (Centers for Diseases Controls and Prevention, 2013; World Health Organization, 2012).

Apesar de muitos esforços realizados em todo o mundo, para reduzir o número de casos de tuberculose resistentes, a OMS estima que a cada ano surgem 440.000 casos de tuberculose multirresistente (TB-MR), incluindo 150.000 mortes e 25.000 a 50.000 casos de tuberculose extremamente resistente (TB-XDR). A TB-XDR está presente em mais de 58 países (European Lung Foundation, 2013; Lemos and Matos, 2013).

Noventa e cinco por cento dos casos de tuberculose ocorrem em países em desenvolvimento, onde poucos recursos estão disponíveis para garantir o tratamento adequado e a infecção por VIH muitas vezes é comum, agravando assim o problema (American Thoracic Society, 2000).

1.10.2. Em Portugal

Em 2012, foram registados em Portugal 2599 casos de TB, incluindo casos novos e re-tratamentos. A incidência de TB foi de 2399, ou seja, 22,8/100 000 habitantes. Segundo a Direção-Geral da Saúde, os dados representam um decréscimo relativamente à taxa de incidência definitiva em 2011 (23,2/100 000 habitantes) de 0,5% (Duarte and Diniz, 2013).

Segundo o relatório sobre o Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho, do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, da Direção-Geral de Saúde, Portugal continua a ser um país de incidência intermédia – o único da Europa Ocidental, apesar de se continuar a assistir a uma diminuição constante da taxa de incidência (Centers for Diseases Controls and Prevention, 2013; Duarte and Diniz, 2013).

A identificação precoce e o tratamento adequado dos casos de tuberculose é a estratégia mais adequada para prevenir a transmissão da doença na comunidade (Correia, Valente and Duarte, 2013).

De acordo com a Figura 4, em 2012, as regiões com maior incidência de TB foram os distritos de Viana do Castelo (26,7/100000 habitantes), Porto (37,4/100000 habitantes), Lisboa (34,9 /100000 habitantes), Setúbal (25,5/100000 habitantes) e Faro (23,7/100000

habitantes). Observou-se o desaparecimento de regiões com alta taxa de incidência (≥ 50 casos/100000 habitantes) (Duarte and Diniz, 2013).

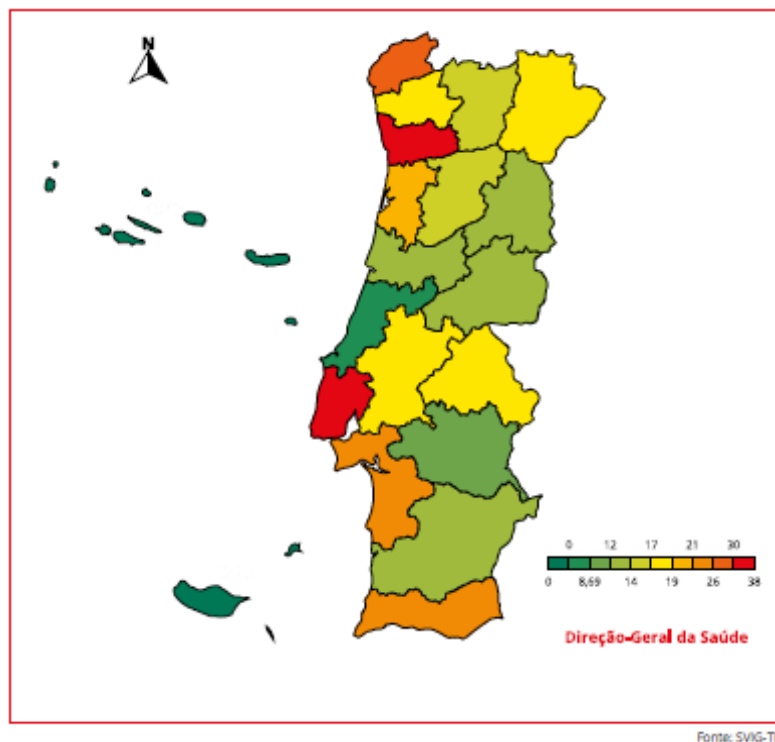


Figura 4. Representação esquemática da taxa de novos casos de tuberculose por 100 mil habitantes, por distrito, em Portugal, em 2012 (Adaptado de (Duarte and Diniz, 2013))

O aparecimento e a transmissão da tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) constituem uma grande ameaça para o controle da tuberculose em vários países (Perdigão *et al.*, 2013).

Durante o ano de 2012, 82% dos casos de tuberculose com cultura positiva foram sujeitos ao teste de sensibilidade a fármacos de primeira linha, sendo que 5,6% destes casos apresentaram resistência à isoniazida. O número de novos casos de TB-MR têm, vindo a diminuir, sendo que em Dezembro de 2012, a incidência foi de 16 casos, dos quais 25% apresentavam TB-XDR, representando 0.6% do total de casos de tuberculose testados. As áreas metropolitanas do Porto, de Lisboa, e do Vale de Tejo apresentaram uma maior frequência de TB-MR (Duarte and Diniz, 2013).

1.10.2.1. Legislação em Vigor

A tuberculose é uma doença de declaração obrigatória, desta forma possui legislação (Direção Geral da Saúde, 2013):

- Circular Normativa nº 8 de 29/05/00

Sistema de informação intrínseco ao programa de tuberculose – Registo de casos e monitorização dos resultados. Esta norma tem por finalidade normalizar critérios a aplicar a nível nacional, respeitante à classificação dos casos de tuberculose para efeito de registo, de notificação e monitorização dos resultados (Direção Geral da Saúde, 2000).

- Circular Normativa nº 6 de 13/03/01

O sistema de informação intrínseco ao Programa Nacional de Tuberculose (PNT) tem uma componente de base clínica para registo e acompanhamento dos casos de Tuberculose (TB) enquadrada na estratégia *Direct Observed Therapy Short Course Treatment* (DOTS) para monitorização dos índices de frequência e dos resultados do tratamento. De modo a englobar todos os critérios de monitorização da TB e dos problemas emergentes associados, foi criada a aplicação informática Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG-TB) para substituir a aplicação informática anterior (Direção Geral da Saúde, 2001).

- Circular Normativa nº 12 de 17/07/08

A criação desta norma tem por objetivo a deteção rápida de tuberculose multirresistente, o que permite um rápido controlo da tuberculose multirresistente, uma vez que permite isolar o doente e prevenir a expansão do espectro de multirresistência. A OMS propõe a execução desta norma sempre que houver casos de produtos biológicos com microscopia positiva para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) (Direção Geral da Saúde, 2008).

- Circular Normativa nº 19 de 17/10/07

Este circular tem por objetivo o rastreio de infeção VIH nos doentes com tuberculose. Em Portugal a tuberculose constitui a principal doença definidora de SIDA, a coinfeção VIH deve ser diagnosticada o mais precocemente possível, de forma a permitir a correta orientação dos doentes e diminuir as repercussões na morbilidade e na mortalidade (Direção Geral da Saúde, 2007).

- Circular Normativa nº 9 de 29/05/00

Resistência aos anti bacilares. Este programa permite reduzir a morbilidade e mortalidade da tuberculose, conhecer o perfil de resistência aos anti bacilares, avaliar e reforçar a qualidade do tratamento da tuberculose, identificar grupos populacionais com risco acrescido de resistência aos anti bacilares, por forma a adotar as medidas de ação necessárias e apropriadas para a prevenção do desenvolvimento e transmissão da resistência aos anti bacilares (Direção Geral da Saúde, 2000).

- Circular Normativa nº 1/DT de 11/01/07

Testes de sensibilidade aos anti bacilares de 2ª Linha. A criação desta norma tem em vista a otimização dos recursos e obtenção de dados dos testes de sensibilidade aos anti bacilares (TSA) que permitam a formulação precoce de regimes personalizados de tratamento, a definição de caso e a monitorização dos resultados (Direção Geral da Saúde, 2007).

1.10.3. Em Cabo Verde

A tuberculose afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é considerada como um problema de saúde pública em Cabo Verde. A pobreza, as deficientes condições sanitárias e a coinfeção por VIH constituem os principais fatores de instabilidade no combate à tuberculose.

A incidência da tuberculose em Cabo Verde têm, vindo a aumentar ligeiramente desde 2010. Quando, neste ano foram registados 386 casos, sendo que 338 destes casos eram novos. Em 2011 o número de casos registados aumentou para 400 casos, dos quais 373 eram novos casos enquanto, que em 2012 registaram-se 414 casos de acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde de Cabo Verde (Delgado *et al.*, 2013).

Os dados apresentados refletem um aumento da incidência de tuberculose no país, este aumento pode ser justificado por diversos fatores como as deficientes condições sanitárias e ainda a uma fraca adesão aos cuidados de saúde.

Segundo os dados oficiais do Ministério de Saúde de Cabo Verde, em 2012, a tuberculose pulmonar constituiu uma das principais causas de mortalidade entre as doenças infecciosas, apenas superado pela SIDA e a septicemia. Estas infeções contribuíram com cerca de 75% das mortes causadas por doença infecciosas.

Apesar do custo do tratamento ser suportado pelo estado, ainda a taxa de abandono ao tratamento pode-se considerar elevada, uma vez que em 2008 num universo de 317 casos novos, 14% abandonaram o tratamento. De 2009 a 2012 esta taxa tem vindo a diminuir ligeiramente, chegando a atingir os 8,8% em 2011 (Delgado *et al.*, 2013). Estudos indicam que a não adesão ao tratamento, deve-se ao facto de alguns pacientes apresentarem baixo nível de escolaridade, falta de conhecimento sobre os riscos da doença para saúde pública, hábitos de tabagismo, alcoolismo e uso de outras drogas, falta de recursos financeiros e a duração prolongada do tratamento (Pina, 2013).

Pela análise da Figura 5, pode-se observar que no período de 2008 a 2012, tanto a taxa de incidência como a taxa de prevalência e mortalidade aumentaram. Este aumento deve-se as razões mencionadas previamente e também ao facto dos pacientes procurarem os serviços médicos numa fase avançada da doença (Delgado *et al.*, 2013).

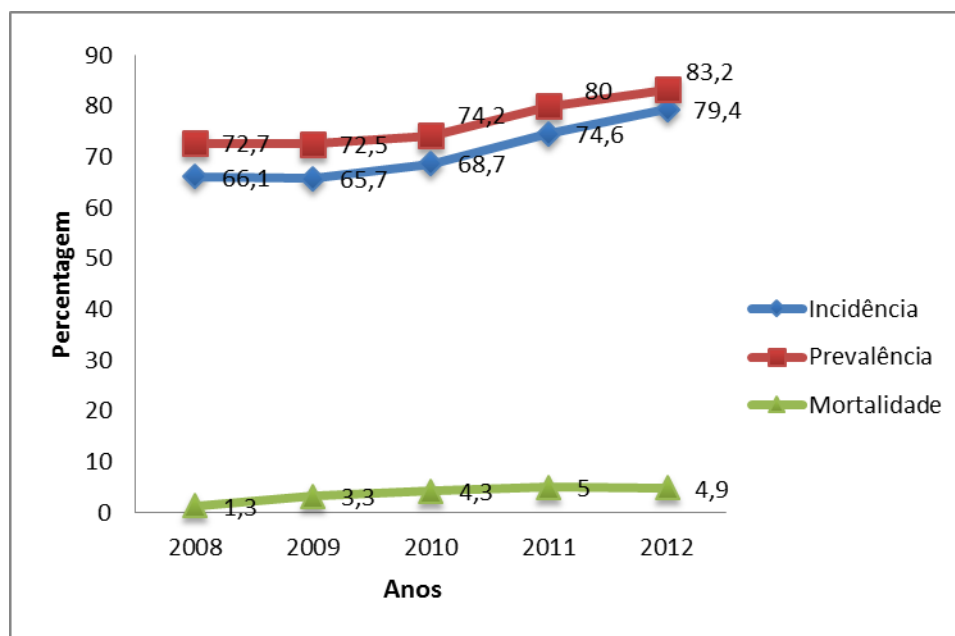


Figura 5. Tuberculose - Incidência, Prevalência e Mortalidade (por 100.000 habitantes) - Cabo Verde 2008 – 2012

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

O estágio, efetuado no âmbito da dissertação mestrado, foi realizado no laboratório de microbiologia clínica, do Centro Hospitalar do Baixo Vouga. Teve como objetivo complementar a minha formação académica, através do contacto direto com a realidade de um laboratório que presta serviços a diferentes serviços do hospital supracitado.

Atualmente a tuberculose continua a ser um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Duarte and Diniz, 2013). Desta forma é fundamental o diagnóstico precoce, rápido e o início de tratamento atempado, de modo a minimizar a transmissão e reduzir a morbilidade e mortalidade causada por esta doença.

A melhoria nas condições de diagnóstico tem sido uma grande valia para uma rápida deteção e identificação das micobactérias e consequentemente contribuir para o controlo da infeção, assim como os estudos epidemiológicos. Neste contexto, este trabalho tem como propósito o estudo do diagnóstico laboratorial e da prevalência da tuberculose no Centro Hospitalar do Baixo Vouga - Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2013.

Especificamente pretendia-se:

- Adquirir conhecimentos, competências e qualificações para uma melhor compreensão dos procedimentos a adotar no diagnóstico da tuberculose.
- Analisar os principais fatores de risco presentes nos doentes diagnosticados no CHBV: infeção por VIH, tabaco, álcool, drogas, algumas doenças, anemia, emigrantes contacto com pessoas infectadas e emigrantes.
- Conhecer e analisar a prevalência da tuberculose por géneros, grupos etários, serviços, produtos biológicos e infeção por VIH, no período de 2008 a 2013.
- Estudar a evolução da incidência da tuberculose no período de 2008 a 2013.
- Estudar o perfil de resistência aos anti bacilares dos isolados de MTC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da tuberculose baseia-se numa combinação de vários métodos, a fim de estabelecer um diagnóstico definitivo da doença. Para tal é necessário efetuar o isolamento e identificação do agente etiológico em amostras respiratórias ou extra respiratórias (Bento *et al.*, 2011; Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007).

Os objetivos do diagnóstico laboratorial no sector de micobactérias passam pelo diagnóstico e monitorização do tratamento da tuberculose. As amostras clínicas para o diagnóstico da tuberculose incluem as amostras estéreis (cavidades fechadas) e não estéreis. As amostras estéreis incluem líquido cefalorraquidiano, sangue, medula óssea, biópsia, líquido pleural, peritoneal, e articular, enquanto que as amostras não estéreis incluem expetoração, urina, aspirado gástrico, exsudados e materiais de autópsia (Ferreira and Sousa, 2000; Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012). As amostras para pesquisa do complexo *M. tuberculosis* devem ser processadas num laboratório especializado em testes para o diagnóstico da tuberculose.

O exame mico bacteriológico é composto por cinco partes (Centers for Disease Control and Prevention, 2013):

- Colheita e transporte das amostras;
- Tratamento das amostras;
- Exame mico bacteriológico direto e cultural;
- Biologia molecular – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês PCR) em tempo real;
- Teste de sensibilidade aos anti bacilares.

3.1.1. Colheita e transporte das amostras

O material biológico a colher é variável, dependendo da suspeita clínica relativamente à localização das lesões tuberculosas. Habitualmente são produtos oriundos do trato respiratório, como a expetoração, secreções brônquicas, líquido pleural ou biópsias. Contudo o material biológico pode ainda incluir líquido cefalorraquidiano, sangue, urina, lavados gástricos ou qualquer outro material suspeito (Ferreira and Sousa, 2000).

A colheita e o transporte de produtos biológicos têm grande impacto no resultado de um diagnóstico, isto é, o resultado de um exame microbiológico é consequência da qualidade da colheita, do transporte do produto biológico, assim como também das técnicas adequadas de processamento e dos meios de cultura utilizados pelo laboratório (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Lago, 2012).

A colheita deve-se ser feita antes de iniciar a terapêutica, em que os recipientes esterilizados para a recolha das amostras estejam devidamente identificados com os dados do paciente e não devem ser enchidos além de 2/3 da sua capacidade. É importante que sejam recolhidas múltiplas amostras em dias diferentes, de forma a aumentar a taxa de deteção. Geralmente, são necessárias pelo menos três amostras de expetoração, em dias consecutivos, em intervalos de 8 a 24 horas em que pelo menos uma amostra tem de ser colhida logo pela manhã (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Lago, 2012).

A Figura 6, ilustra que as amostras devem ser obtidas numa sala de isolamento porque durante a colheita os pacientes produzem aerossóis que podem ser perigosos para os profissionais de saúde ou outros pacientes nas proximidades (Control and Prevention, 2013).



Figura 6. Um paciente a tossir numa camara isolada.

Como se pode verificar pela análise da Figura 7, as amostras de expetoração podem ser classificadas segundo o exame macroscópico, em "salivar" quando consiste principalmente de saliva, "muco" quando é principalmente muco, "purulenta" quando apresenta pús amarelada, "muco-purulenta" quando existem partículas amareladas visíveis no muco e ainda por "*bloody*", quando contém sangue (Dawson, 2000; Lumb *et al.*, 2013).



Figura 7. As diferentes formas de amostras de expetoração.

➤ **Métodos de colheita de amostra para a tuberculose pulmonar**

Existem quatro métodos de colheita de amostras para a TB pulmonar: tosse, expetoração induzida, broncoscopia e aspiração gástrica.

- **Tosse**

A tosse é considerada o método natural de recolha de expetoração, contudo deve ser supervisionada de forma a garantir que a expetoração seja colhida corretamente (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

- **Expetoração Induzida**

Para os pacientes que apresentam dificuldades em tossir, deve-se proceder a indução da tosse através da solução salina hipertónica (solução de NaCl em H₂O) (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). A realização de múltiplas (três ou mais) induções aumenta a sensibilidade do diagnóstico (Bento *et al.*, 2011).

- **Broncoscopia**

A broncoscopia é um procedimento médico que permite a visualização do interior das vias respiratórias do paciente. É utilizado particularmente quando os resultados anteriores dos exames são negativos, persistindo a suspeita de tuberculose, pois este método aumenta a sensibilidade do diagnóstico (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Iyer *et al.*, 2011).

- **Aspiração gástrica**

A aspiração gástrica é um procedimento usado com objetivo de obter uma amostra para cultura, quando um paciente não pode tossir expetoração suficiente. Normalmente insere-se um tubo pela boca ou nariz até ao estômago para recuperar a expetoração que o paciente engoliu aquando tossia (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

➤ **Métodos de colheita de amostras para tuberculose extrapulmonar**

A tuberculose pode ocorrer em qualquer órgão, sendo assim, para além da expetoração são colhidas amostras de urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, pús ou amostras de biópsia, quando há suspeita de tuberculose extra pulmonar (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

3.1.2. Tratamento das amostras

Todos os procedimentos devem ser realizados num laboratório de classe II A ou B ou com câmara de segurança biológica III (*biological safety cabinet* - BSC). Para a manipulação de amostras com *M. tuberculosis* é recomendado o Nível 3 de Biossegurança. No entanto, para a realização do exame direto para pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes é fortemente recomendado o Nível 2 de Biossegurança (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007).

Tendo em consideração a natureza das amostras e o tipo de exame microbiológico requisitado, é fundamental que as amostras passem pelo processo de homogeneização/descontaminação e concentração (Ferreira and Sousa, 2000; Khéchine and Drancourt, 2011). As amostras que chegam ao laboratório para exame mico bacteriológico direto e cultural devem ser tratadas de forma segura (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007).

➤ **Homogeneização/ Descontaminação**

A homogeneização/descontaminação tem a finalidade de liquefazer o material orgânico e destruir a flora bacteriana contaminante, pois esta cresce mais rapidamente do que as micobactérias, impedindo o crescimento destas. As amostras estéreis são semeadas diretamente no meio sólido, enquanto as amostras não estéreis precisam de ser homogeneizadas/descontaminadas e de seguida semeadas em meio líquido (*middlebrook*) e em meio sólido (*Lowenstein-Jensen*) (Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012; Murray *et al.*, 2007; Nicol and Zar, 2011).

➤ **Concentração**

A concentração feita por centrifugação destina-se a aumentar a sensibilidade da microscopia e do exame cultural (Ferreira and Sousa, 2000). Este método permite aumentar a sensibilidade tanto do exame micro bacteriológico direto como do exame cultural (Nicol and Zar, 2011).

Os métodos de concentração são centrifugação e sedimentação. A centrifugação é considerada eficaz no diagnóstico da tuberculose pulmonar, principalmente em amostras de expectoração paucibacilares e com sangue (Ravishankar *et al.*, 2013).

A centrifugação é mais eficiente para a concentração das micobactérias. A sedimentação aumenta significativamente a sensibilidade da baciloscopia e este método pode ser alternativo para centros de diagnóstico que não estão equipados com uma centrífuga (Shinu *et al.*, 2012).

3.1.3. Exame micro bacteriológico direto (Baciloscopia)

O exame micro bacteriológico direto também designado por baciloscopia consiste na pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes numa amostra clínica através do microscópio, após aplicação de um método de coloração (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007). Neste estudo utilizou-se a coloração de *Ziehl-Neelsen*, pois trata-se de um método simples de executar e continua a ser particularmente importante no combate da tuberculose. Os procedimentos deste método estão descritos no anexo I.

Tal como se observa na Figura 8, as micobactérias são consideradas bacilos álcool ácido resistentes, porque resistem à descoloração por álcool acidificado (ácido clorídrico a 3%) após a aplicação prolongada de um corante básico, "fucsina" ou com aquecimento deste corante (Forbes, Sahm and Weissfeld, 2007; Murray *et al.*, 2007). Esta resistência deve-se principalmente ao elevado teor de ácidos micólicos, ácidos gordos de cadeia longa e ligação cruzada, bem como a presença de outros lípidos que estão ligados a arabinolactanos e peptidoglicanos da parede celular das micobactérias como descrito anteriormente (Fauci *et al.*, 2008).

A baciloscopia constitui um exame básico na rotina laboratorial, é uma técnica eficaz, fácil, rápida e económica, mas não é específico, pois permite apenas identificar BAAR, sendo necessário proceder-se a identificação da espécie do microrganismo através de outros métodos. Para além do diagnóstico presuntivo tem um papel importante na monitorização terapêutica, uma vez que permite avaliar a eficácia dos anti bacilares através da contagem da carga bacilar nas amostras do doente (Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012; Lumb *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2007). Uma baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico da tuberculose, deve-se ter em conta o resultado do exame cultural para micobactérias (Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012; Lumb *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2007). De forma a aumentar a sensibilidade deste método, recomenda-se a colheita e análise de três amostras do produto biológico em dias consecutivos (Federal Ministry of Health Ethiopia, 2008; Ramos *et al.*, 2013). A TB pulmonar é confirmada quando pelo menos 1 dos 3 exames diretos dão resultados positivos para BAAR (Ramos *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que deve haver 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de amostra, para permitir a sua deteção num exame direto. Quanto maior a quantidade de bacilos presentes, mais avançada se encontra a doença (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Lin *et al.*, 2011).

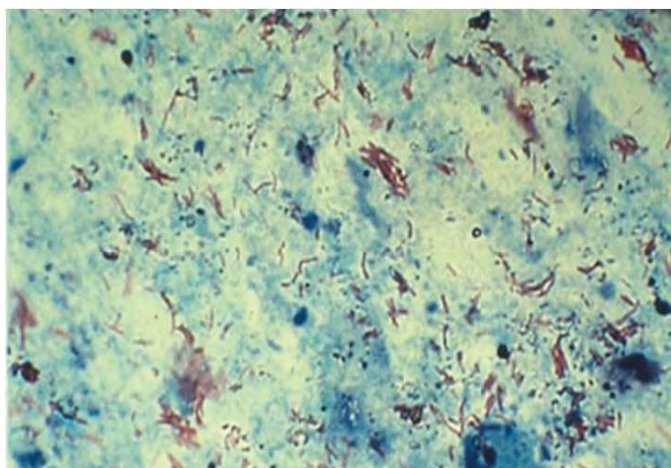


Figura 8. Bacilos do complexo *M. tuberculosis* a vermelho, após a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

3.1.4. Exame mico bacteriológico cultural

O exame cultural é o único método que confirma a viabilidade das micobactérias ao permitir o crescimento de colónias das mesmas e é considerado o método “gold-standard” (Bento *et al.*, 2011; Essa *et al.*, 2013). No entanto, trata-se de um método excessivamente lento e requer procedimentos especiais de segurança nos laboratórios. Este método permite obter a cultura e o isolamento do complexo *M. tuberculosis*, após várias semanas de incubação, devido ao facto de possuírem crescimento lento (Ravishankar *et al.*, 2013).

A obtenção de uma cultura positiva define um caso de tuberculose ativo, permite avaliar a sensibilidade aos fármacos anti bacilares e demonstrar a eficácia do tratamento. Geralmente, a presença de 10 bacilos/mililitro de amostra permite obter uma cultura positiva, tal facto torna este método, mais sensível do que o exame direto. A sensibilidade do exame cultural é de 80-85% e a especificidade de aproximadamente 98% (Bento *et al.*, 2011; Khéchine and Drancourt, 2011; Lin *et al.*, 2011). Para melhorar a especificidade do diagnóstico, recomenda-se a utilização do meio sólido e líquido, pois os meios líquidos não permitem a quantificação do crescimento das micobactérias e são particularmente propícios à contaminação por outras bactérias (Bento *et al.*, 2011).

3.1.4.1 Meio de cultura sólido - *Lowenstein-Jensen*

O meio de *Lowenstein-Jensen* (LJ) destina-se, ao crescimento de micobactérias provenientes de amostras de produtos biológicos estéreis e não estéreis (Essa *et al.*, 2013). Trata-se de um meio enriquecido com a presença de ovo, asparagina e fécula para favorecer o crescimento de micobactérias, estas apresentam colónias com aspeto de “couve-flor” e contêm o verde de malaquite como agente inibidor de crescimento de outras bactérias, como pode-se observar na Figura 9 (BioMérieux, 2003; Essa *et al.*, 2013; Khéchine and Drancourt, 2011).

O meio de LJ permite uma leitura quantitativa através da contagem do número de colónias, tornando-o mais adequado para a monitorização terapêutica, embora o crescimento seja mais demorado, sendo necessárias cerca de 2 a 3 semanas para obter uma cultura positiva (Bento *et al.*, 2011). Os meios de cultura, depois de semeados, são incubadas a 37°C sob atmosfera de CO₂ (5-10%) durante 6 a 8 semanas, de forma inclinada

e normalmente são observados duas vezes por semana até se observarem as colónias de micobactérias (Lin *et al.*, 2011). Após o aparecimento de colónias de micobactérias, procede-se a realização de um exame direto, usando a coloração de *Ziehl-Neelsen* para confirmar a presença de BAAR. Geralmente, 40 a 70% dos doentes com culturas positivas apresentam exame direto positivo (Essa *et al.*, 2013).

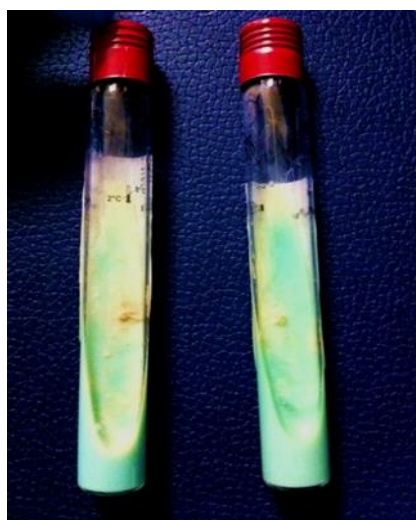


Figura 9. Aspeto das colónias de micobactérias em meio de *Lowenstein-Jensen*, obtida no laboratório de microbiologia do CHBV E.P.E.

3.1.4.2 Meio de cultura sólido - Gelose de chocolate

A gelose de chocolate (Gelose Chocolate PolyViteX, PVX, bioMérieux®) é um meio de cultura não seletivo enriquecido com fator X (hemina) e V (NAD), utilizada, por exemplo para o crescimento de estirpes fastidiosas pertencentes aos géneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Streptococcus*. Este meio é utilizado neste estudo para repicagem de amostras de culturas positivas provenientes dos meios de culturas líquidas do VersaTREK e do Bact/ALERT, a fim de detetar a presença de outras bactérias contaminantes, pois este meio não permite o crescimento de micobactérias (BioMérieux, 2003, 2014).

3.1.4.3 Meio de cultura líquido – BacT/ALERT 3D

O sistema BacT/ALERT 3D é um método colorimétrico, que utiliza um sensor para detetar o crescimento de micobactérias nos frascos de hemoculturas. Este sensor monitoriza a presença de CO₂ dissolvido no meio, deteta de 10 em 10 minutos o aumento de CO₂ e altera a cor de verde para amarelo em caso de haver presença de bactérias (Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012).

As amostras de sangue chegam ao laboratório num frasco de hemocultura para serem incubadas no aparelho BacT/ALERT 3D à uma temperatura de 35-37°C. Antes de se proceder a sua incubação deve-se adicionar o líquido de enriquecimento MB/BacT, pois este suplemento permite o crescimento das micobactérias e outros microrganismos aeróbios, incluindo leveduras, fungos e bactérias. Portanto, se houver cultura positiva deve-se fazer repicagem para o *Lowenstein-Jensen* e gelose de chocolate a fim de avaliar a presença de micobactérias e de contaminações (Bento *et al.*, 2011; BioMérieux, 2008; Lago, 2012).

Na Figura 10, estão representados os procedimentos para a pesquisa de micobactérias, usando o sistema BacT/ALERT 3D.

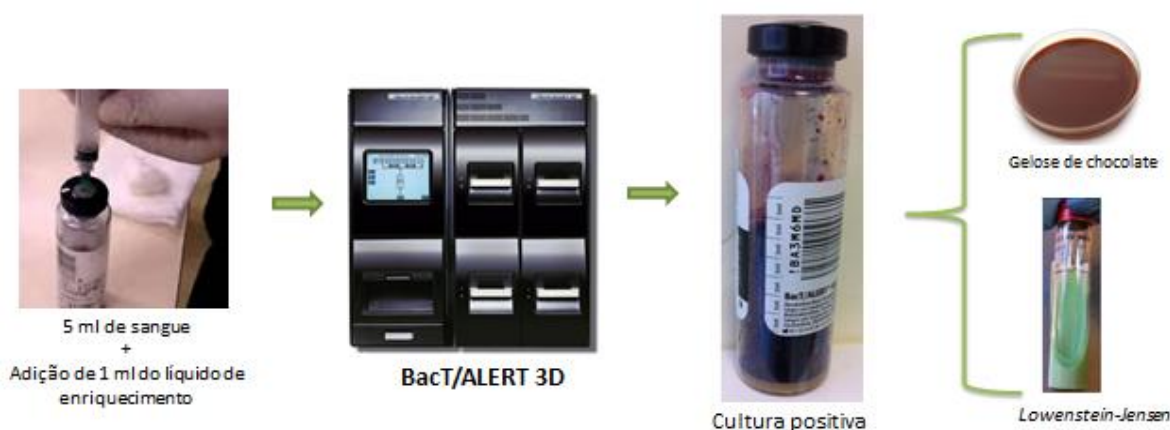


Figura 10. Representação esquemática do procedimento para cultura de micobactérias no aparelho BacT/ALERT 3D (Imagem tirada do CHBV E.P.E.).

3.1.4.4 Meio de cultura líquido – VersaTREK

O VersaTREK é um sistema de cultura para o isolamento de micobactérias. Trata-se de um método pressométrico que utiliza o meio de Middlebrook 7H9. Este meio permite o crescimento de micobactérias. O sistema baseia-se na detecção de mudanças de pressão, faz uma monitorização contínua (de 24 em 24 min) das alterações de pressão (diminuição) resultantes da diminuição de oxigénio (com produção de gás) em consequência do crescimento bacteriano, nos frascos do mesmo. Estes são incubados durante 42 dias, o que é considerado o tempo necessário para a detecção de culturas positivas (Gravet *et al.*, 2011; Khéchine and Drancourt, 2011; Lago, 2012). Os procedimentos encontram-se descritos no anexo I.

3.1.5. Biologia molecular – PCR em tempo real

A identificação definitiva do microrganismo requer métodos moleculares, que baseiam na detecção de ácidos nucleicos ou na amplificação do ácido desoxirribonucleico. Normalmente, estes métodos são mais rápidos do que os exames culturais (Bento *et al.*, 2011; Nicol and Zar, 2011).

Das novas abordagens para o diagnóstico rápido da tuberculose, os métodos de amplificação de ácidos nucleicos são as mais promissoras (Ravishankar *et al.*, 2013).

Neste estudo utilizou-se o aparelho da EZ1, trata-se de um método molecular de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN). Este método usa a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RTq-PCR) para identificar o complexo *M. tuberculosis*, diretamente do produto biológico ou a partir da amostra da cultura positiva. Trata-se de um método sensível, específico e rápido (Duarte, Paixão and David, 2012; Hwang *et al.*, 2013) (Ver os procedimentos no Anexo I).

O PCR em tempo real deteta a presença do ácido nucleico alvo amplificado num sistema fechado, o que reduz o risco de contaminação cruzada entre amostras previamente amplificadas (Nicol and Zar, 2011). De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* e a *American Thoracic Society*, os testes de amplificação de ácidos nucleicos são capazes de reforçar a segurança do diagnóstico, no entanto não substituem o exame

mico bacteriológico direto e o exame cultural. Estes dois exames podem facilitar decisões sobre iniciar o tratamento para tuberculose ou uma infecção pulmonar não-TB (Lin *et al.*, 2011).

Procedimentos:

O sistema realcycler MTC inclui uma mistura de reação de AmpliMix para a detecção do complexo *M. tuberculosis* dispensado em tubos ou amplificação e um controlo positivo ADN *M. tuberculosis*, como pode-se ver na Tabela 2. A mistura de reação permite a co-amplificação ou um controlo interno que permite descartar os falsos negativos devido a inibição da reação. Todos os reagentes estão prontos a usar sem adicionar nem reconstituir nenhum componente.

Tabela 2. Componentes do sistema realcycler MTC.

Componente	Tubos	Volume (mL)	Conservação (°C)
Amplimix	24	15	-15/-25
Controlo positivo			
ADM <i>M. tuberculosis</i>	1	120	-15/-25

Preparação da reação

- Descongelar os tubos AmpliMix necessários para amplificar as amostras e o controlo positivo;
- Adicionar 10 ml do DNA das amostras e do controlo positivo a cada tubo de AmpliMix;
- Centrifugar os tubos para que a mistura passe a zona ótica do tubo verificar que não se formam bolhas no ar.

Todos os componentes do kit devem manter-se em frio enquanto estão a ser manipulados. Depois de adicionar o DNA, minimizar o tempo para iniciar o programa de amplificação.

Os tubos com a mistura de amplificação não devem ser expostos à luz durante um período de tempo prolongado. Na Tabela 3 estão representados as fases da amplificação.

Tabela 3. Fases da amplificação do sistema realcycler MTC.

	Fase	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Aquisição de fluorescência
Amplificação	Ativação	45	95	900	Off
	Desnaturação		95	15	Off
	Hibridização		55	30	On
	Extensão		72	30	Off

Interpretação dos resultados

- A presença de *Mycobacterium* é detetada pela fluorescência emitida por FAM.
- A amplificação do controlo interno é detetada pela fluorescência emitida por Alexa 532
- Não se deteta sinal em Alexa532 nem em FAM: Amostra inválida

3.1.6. Testes de suscetibilidade aos anti bacilares (TSA)

Para além do isolamento do complexo *M. tuberculosis* e da sua identificação, a determinação da suscetibilidade aos anti bacilares constitui também parte integrante do laboratório de mico bacteriologia (Bento *et al.*, 2011).

A Direção Geral de Saúde estabelece que devem ser solicitados e efetuados testes de susceptibilidade aos anti bacilares de primeira linha a todos os casos com isolamento do complexo de *M. tuberculosis* em cultura, classificados como novos e retratamentos.

Após a identificação do MTC, procede-se à realização do teste de susceptibilidade aos anti bacilares com a finalidade de determinar o perfil de resistências aos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, isoniazida, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida e etambutol. Para a realização deste teste, utilizou-se o sistema VersaTREK, com as concentrações de anti bacilares de acordo com a Tabela 4. Para a preparação dos anti bacilares ver os procedimentos no anexo I.

Os resultados deste teste devem direcionar os médicos a escolher a terapêutica mais adequada para cada doente (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Tabela 4. Procedimento: Antibiógrama com as duas concentrações de isoniazida, etambutol e estreptomicina.

	Identificar os frascos com a concentração usada e com a identificação do paciente	Volume GS	Volume de Antibiótico	Diluição 1:10 do frasco positivo
1	Controlo SIRE	1 ml	0,5 de água destilada	0,5 ml
2	1 µ/ml Rifampicina	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
3	0,1 µg/ml Isoniazida	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
4	0,4 µg/ml Isoniazida	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
5	5 µg/ml Etambutol	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
6	8 µg/ml Etambutol	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
7	2 µg/ml Estreptomicina	1 ml	1 ml	0,5 ml
8	8 µg/ml Estreptomicina	1 ml	1 ml	0,5 ml
9	300 µg/ml Pirazinamida	1 ml	1 ml	0,5 ml
10	Controlo PZA	1 ml	1 ml de tampão	0,5 ml

Para repicagem para o frasco versaTREK, caso o antibiógrama não possa ser executado nas 72 horas ao frasco ter positivado.

➤ A partir da cultura em *Lowestein-Jensen*

Procedimento:

1. Fazer uma suspensão de 1,0 Mc Farkand.
2. Inocular em frasco do versaTREK 0,5 da suspensão anterior + 1,0 ml de GS.

➤ A partir de cultura em meio líquido

1. Inocular em frasco do versaTREK 0,5 da cultura +1,0 ml de GS

Importante: O antibiograma é efetuado no máximo até 72 horas após a cultura ter sido positiva.

4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A tuberculose é uma doença já muito antiga, mas continua a ser uma das principais causas de mortalidade e morbilidade em todo mundo. Embora a incidência tenha diminuído nos últimos anos nos países da Europa Ocidental, esta epidemia continua a ser elevada devido a diversos fatores entre os quais constam a crescente imigração, o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, as resistências aos anti bacilares e o aumento do uso de imunossuppressores (Abdallah *et al.*, 2011).

Em Portugal, de acordo com os dados publicados no relatório “Infeção VIH/SIDA e Tuberculose em números – 2013” têm-se verificado uma redução da percentagem anual de incidência de tuberculose e também a tuberculose multirresistente tem diminuído de forma consistente (Duarte and Diniz, 2013). Apesar desta redução, Portugal mantém os valores acima da média Europeia. Uma das dificuldades enfrentadas durante o tratamento é o surgimento de estirpes resistentes aos anti bacilares, devido à aplicação de um regime terapêutico inadequado ou à não adesão ao tratamento. Tal situação tem posto em causa o controlo da doença (Duarte *et al.*, 2010; INSA, 2014).

Nos programas estratégicos de controlo da tuberculose deve-se ter em consideração diversos factores, principalmente as mudanças demográficas, uma vez que estes fatores retardam o progresso do controlo da doença (Murray *et al.*, 2014). No entanto, vários outros fatores contribuem para a distribuição desigual da incidência da tuberculose, nomeadamente infeção adquirida no país de origem dos emigrantes, distribuição desigual de alguns fatores de risco que contribui para um aumento da exposição à TB, doentes infetados com VIH, a situação socioeconómica desfavorável e os efeitos de aglomeração (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

A deteção rigorosa e rápida e a vigilância epidemiológica são de primordial importância para a redução da mortalidade e morbilidade causada por esta infeção. Desta forma, o laboratório tem um papel importante na confirmação dos casos de TB, com isolamento do agente etiológico e subsequente estudo de suscetibilidade aos anti bacilares (INSA, 2014).

Segundo as Nações Unidas, os progressos científicos têm vindo a aumentar a percentagem de casos detetados, no entanto a taxa de doentes com acesso ao tratamento é muito lento em muitas regiões do Mundo (United Nations Department, 2013). Tal situação

não se verificou em doentes atendidos no CHBV, pois consta nos dados registados desta unidade hospitalar e como pode-se observar na Tabela 6, em que 98.9% de doentes infetados por MTC tiveram sucesso no tratamento, no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2013.

Estudos indicam que a maior parte dos infetados com TB são pessoas que vivem nas comunidades mais pobres e mais vulneráveis do mundo, ou estão entre as populações marginalizadas como os trabalhadores migrantes, refugiados, prisioneiros, os indígins e usuários de drogas (Organização Pan-Americana de Saúde, 2014). Conforme descrito anteriormente a transmissão da infeção, está diretamente relacionado com a quantidade de de bacilos do MTC que o doente expira para o ar, isto é, os doentes que expiram muitos bacilos têm mais potencial de transmitir a infeção. Para além da quantidade dos bacilos expirados, deve-se ter em atenção os seguintes grupos de pessoas (Centers for Disease Control and Prevention, 2013):

- Pessoas que estão em contacto com suspeitos ou infetados com TB;
- Pessoas que visitam áreas com alta prevalência da TB, especialmente se as visitas forem frequentes ou prolongadas;
- Nascidos no exterior, das áreas com alta incidência de TB (ex. África, Asia, Europa Leste, America Latina e Russia);
- Os profissionais de saúde que atendem os pacientes que estão com risco elevado para tuberculose;
- Populações definidas localmente como, tendo um aumento da incidência de infeção latente por *M. tuberculosis* ou doença TB, incluindo possivelmente, as populações de baixo rendimento, com saúde vulnerável, ou ainda toxicodependentes e alcoólicos;
- Bêbês, crianças e adolescentes expostos a adultos que estão em risco aumentado de TB ou infeção latente de TB.

De acordo com o Despacho n.º 5681-A/2014 do Diário da República, 2.ª série — N.º 82 — 29 de abril de 2014, a tuberculose deve ser notificada quer se trate de casos possíveis, prováveis ou confirmados, nos termos do Regulamento de Notificação Obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública, previsto no n.º 1

do artigo 16.º da Lei n.º 81/2009, de 21 de Agosto. Segue-se a definição e classificação dos casos (Ministério da Saúde, 2014):

Critérios clínicos

Pessoa que preenche os dois critérios seguintes:

- Sinais, sintomas e ou imagens radiológicas compatíveis com tuberculose ativa, qualquer que seja a sua localização.
- Decisão tomada por um médico de administrar ao doente um ciclo completo de terapia antituberculose. Ou
- Resultados anatomopatológicos necrópsicos compatíveis com tuberculose ativa, que tivessem exigido tratamento antibiótico antituberculose, caso o diagnóstico tivesse sido feito em vida.

Critérios laboratoriais

Critérios laboratoriais de caso confirmado:

Pelo menos um dos dois critérios seguintes:

- Isolamento cultural do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (com exclusão de *Mycobacterium bovis*-BCG) numa amostra biológica;
- Detecção de ácido nucleico do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa amostra biológica e baciloscopia positiva por microscopia ótica convencional ou fluorescente.

Critérios laboratoriais de caso provável:

Pelo menos um dos três critérios seguintes:

- Baciloscopia positiva por microscopia ótica convencional ou fluorescente;
- Detecção de ácido nucleico do complexo *Mycobacterium tuberculosis* numa amostra biológica;
- Exame histológico em que se revelam lesões granulomatosas

Critérios epidemiológicos

- Não aplicável.
- Caso possível - Pessoa que preenche os critérios clínicos.
- Caso provável - Pessoa que preenche os critérios clínicos e laboratoriais de caso provável.
- Caso confirmado - Pessoa que preenche os critérios clínicos e laboratoriais de caso confirmado.

A fim de cumprir os objetivos propostos, foram estudados para cada caso de tuberculose os seguintes dados: o sexo, a idade, o tipo da amostra, o perfil de suscetibilidade do microrganismo, o serviço requisitante e a existência de coinfeção com VIH.

Os dados apresentados na Figura 11 e na Tabela 5, referem-se a todos os pacientes que deram entrada no Hospital Infante D. Pedro/CHBV E.P.E entre Janeiro de 2008 e Dezembro de 2013, com suspeita de TB. Pode se observar na Tabela 5 que dos 3564 casos possíveis, 5% foram casos confirmados.

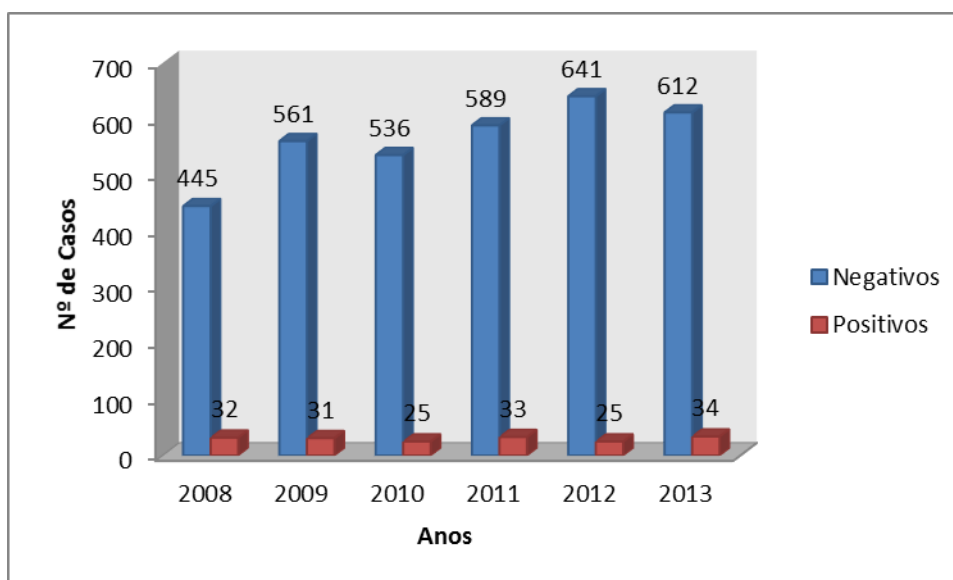


Figura 11. Número de casos negativos e positivos de isolados de MTC.

Tabela 5. Resumo do número de doentes que deram entrada no Hospital Infante D. Pedro/CHBV E.P.E., para pesquisa de MTC, no período de 6 anos.

Classificação dos casos	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Proporção
Novos Casos Positivos	31	30	25	33	25	34	178 (5%)
Casos Negativos	445	561	536	589	641	612	3384 (94,9%)
Recidiva	1	1	0	0	0	0	2 (0,1%)
Total	477	592	561	622	666	646	3564(100%)

No CHBV, durante o período de 2008 a 2013, foram diagnosticadas 180 casos de tuberculose, incluindo retratamentos, como pode-se observar na Tabela 6. Estes dados mostram que a tuberculose continua a ser um problema de saúde pública, pelo que as medidas de prevenção e controlo da tuberculose devem ser reforçadas, com a finalidade de prevenir e reduzir a sua incidência na população abrangida por este centro hospitalar.

Tabela 6. Resumo do número de doentes com isolados de MTC que deram entrada no Hospital Infante D. Pedro/CHBV E.P.E. no período de 6 anos.

Classificação dos casos	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Proporção
Novos Casos Positivos	31	30	25	33	25	34	178 (98.9%)
Recidiva	1	1	0	0	0	0	2 (1.1%)
Total	32	31	25	33	25	34	180(100%)

4.1. Evolução dos casos de tuberculose

Os dados obtidos no período em estudo, revelam que houve uma variação ligeiramente acentuada no número de casos de tuberculose conforme mostra a Figura 12. Do ano de 2008 a 2012 observou-se uma diminuição de novos casos, com exceção de 2011, em que a taxa de novos casos aumentou, é de salientar que este facto ocorreu devido a fusão dos Hospitais de Infante D. Pedro EPE, Distrital de Águeda e Visconde de Salreu, mais precisamente no dia 2 de Março de 2011 conforme descrito anteriormente,

aumentando assim a população abrangida por este centro hospitalar. No entanto, em 2013, o aumento da incidência poderá ter origens em diversos fatores de risco, para além do já mencionado aumento da população.

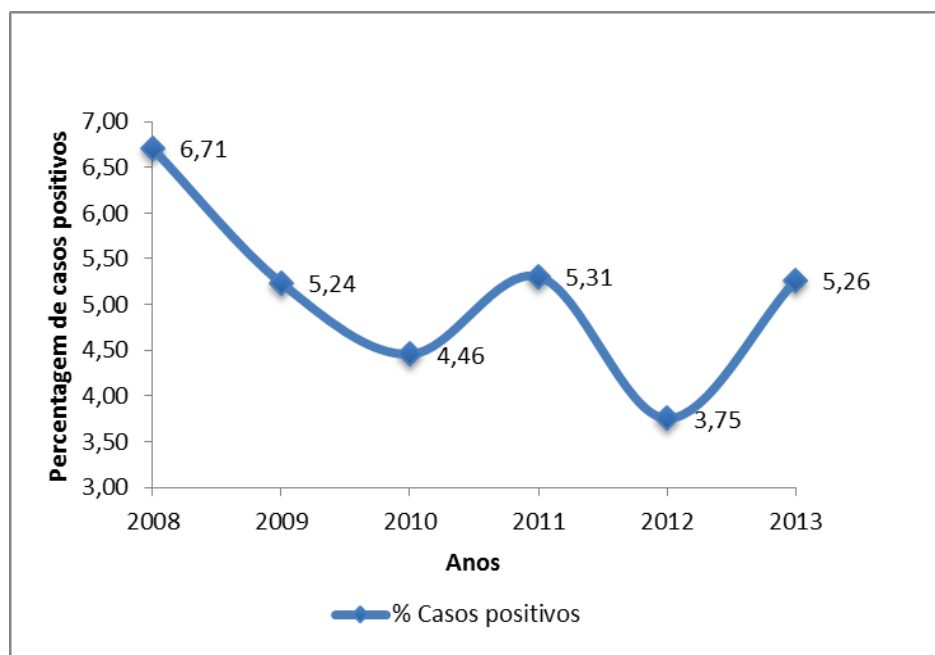


Figura 12. Evolução da proporção de casos de tuberculose, no período de 2008 a 2013.

No período de 2002 a 2012, tem-se observado uma evolução positiva na diminuição da incidência da TB em Portugal, como ilustra a Figura 13 (Macedo *et al.*, 2013), no entanto os dados do presente estudo mostram que a população abrangida pelo CHBV não tem acompanhado este ritmo, pelo que é necessário reforçar e melhorar as estratégias de modo a atingir os objectivos do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose a esta população.

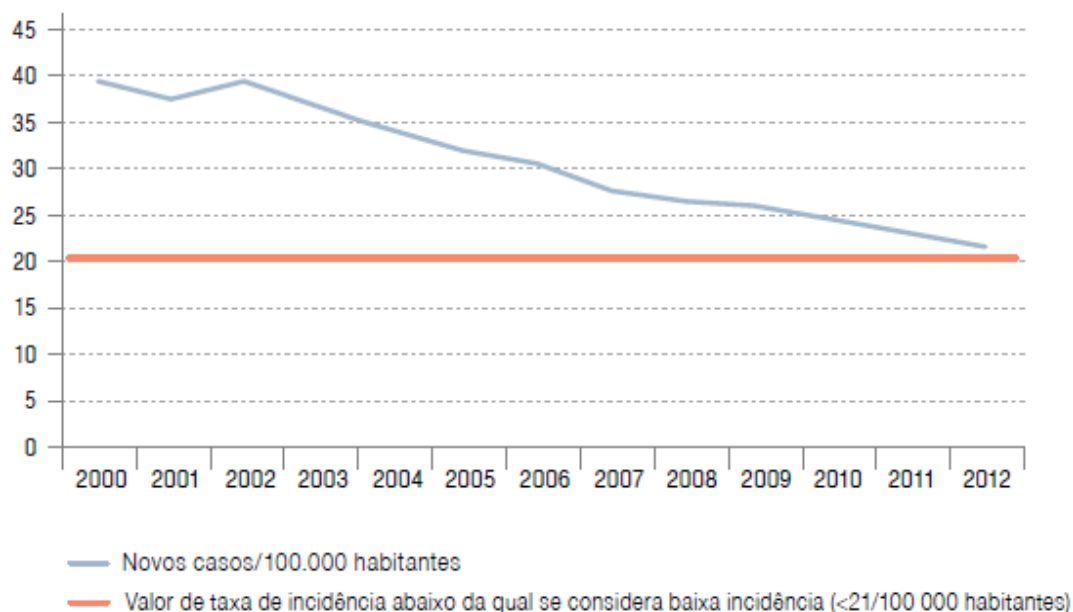


Figura 13. Taxa de incidência dos casos de TB em Portugal, no período de 2002 a 2012 (adaptado de (Macedo *et al.*, 2013)).

4.1.1. Fatores de risco presentes nos doentes diagnosticados com TB

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), qualquer pessoa está sujeita a desenvolver a tuberculose ativa, após a exposição ao agente infeccioso (MTC) através do contacto com pessoas infectadas. No entanto existem fatores relacionados com o hospedeiro que contribuem para a progressão da infeção a doença, tais como infeção por VIH, crianças com menos de 5 anos de idade, pessoas que foram submetidos a um tratamento inadequado para TB, doentes que estão sob tratamento com imunossuppressores, doentes com silicose, diabetes mellitus, insuficiência renal crónica, leucemia ou tumor da cabeça, do pescoço ou do pulmão, pessoas que foram submetidos a gastrostomia ou a jejunostomia, pessoas com peso inferior 90% do seu peso ideal, com dependência de drogas, tabaco e álcool e ainda as que residem numa área com alta incidência de TB.

De entre, os fatores de risco acima mencionados foram identificados alguns nos doentes diagnosticados no CHBV: doenças associadas como diabetes mellitus, insuficiência renal crónica, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), infeção pulmonar por *Staphylococcus aureus*, tumor da cabeça, dependência de drogas, tabaco e álcool, anemia e emigrantes. A dependência de álcool e tabaco foi o fator de risco mais presente nos doentes em estudo, como pode se ver pela análise da Figura 14.

Entre as doenças associadas, doentes com diabetes mellitus apresentam alta incidência. Segundo o CDC os doentes com infeção por TB latente e com diabetes mellitus, e sem tratamento, têm um risco acrescido de 30% de vir a desenvolver a tuberculose ativa (doença), durante a vida (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Ao analisar os dados do CHBV constatou-se que todos os emigrantes diagnosticados com TB, tiveram contacto com pessoas infectadas com TB e a maior parte eram dependentes de tabaco. Embora não terem sido diagnosticados casos de silicose, existem alguns doentes, nomeadamente os emigrantes de França e Espanha, que tiveram contacto com pó de sílica durante o trabalho na construção civil, esta situação remete para suspeita deste fator de risco envolvido no desenvolvimento da tuberculose ativa, apesar de não ter havido nenhuma comprovação clínica.

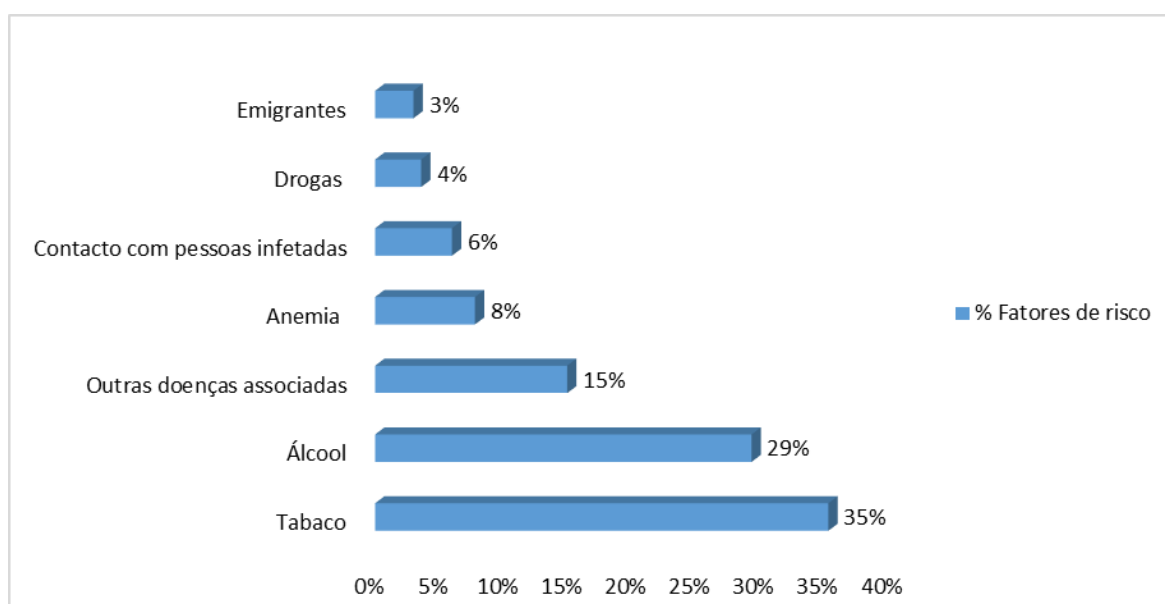


Figura 14. Fatores de risco presentes nos doentes diagnosticados com TB no CHBV, no período de 2008 a 2013.

Segundo a Direção-Geral da Saúde todos os doentes com tuberculose, devem ser testados para o VIH, visto ser um dos factores de risco conhecido para a tuberculose. Ao cumprir esta recomendação descrita na Circular Normativa nº19 de 17/10/07, neste centro hospitalar, verificou-se que apenas 3% dos doentes com tuberculose apresentaram infeção por VIH conforme se verifica na Figura 15.

Muitas vezes o diagnóstico da infeção por MTC, constitui uma forma indireta de descobrir se o indivíduo com tuberculose está ou não infetado pelo VIH, pois a tuberculose

é a doença definidora de SIDA mais comum em todo o mundo (Mendão and Freitas, 2011).

Estudos indicam que doentes com VIH possuem 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver a tuberculose ativa, quando comparado com pessoas que não possuem VIH, porém o risco de desenvolver a doença, após serem infectados pelo *M. tuberculosis* é mais elevada em doentes que não se encontram em tratamento para o VIH, porque as células que auxiliam o sistema imunitário (célula CD4) encontram-se em menos quantidade, embora a tuberculose possa ocorrer em qualquer contagem de células CD4. Tal fato revela a importância do rastreio de VIH, sempre que é diagnosticado um caso de tuberculose (Mendão and Freitas, 2011; Pascopella *et al.*, 2014; Sonnenberg *et al.*, 2004). Em termos globais, todas as instituições envolvidas na prevenção e cuidados do VIH devem incluir no seu programa medidas de controlo de TB. Atualmente, todos os países subdesenvolvidos tem um programa de controlo da TB, embora alguns destes programas são muito frágeis, mas o programa de controlo da tuberculose está presente desde a infância, assim como o tratamento do VIH. Embora o impacto da tuberculose na infeção VIH seja menos evidente, deve-se fazer triagem para TB, terapia preventiva de isoniazida e controle de infeção de TB em associação com as medidas de controlo do VIH (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Nunn, Reid and Cock, De, 2007).

Segundo Lago, a disponibilização de terapia antiretroviral (do inglês ART) para pacientes com TB que subitamente tem VIH, deve aumentar de modo a atender às recomendações de que todos os pacientes com TB seropositivos para VIH, possa receber prontamente ART (Lago, 2012).

Ao longo dos seis anos de estudo, todos os doentes infetados fizeram o teste de rastreio para a tuberculose de acordo com a Circular Normativa nº 19 de 17/10/07. Destes, 3% apresentaram infeção por VIH, por esta prevalência ser muita baixa, mostra que a população em questão não apresenta uma sinergia epidemiologica, podendo estar outros fatores de risco associados aos casos de coinfeção VIH, como condições socio economicas desfavoráveis, condições sanitárias precárias e ainda intervenções inadequadas (Care, 2014).

Diversos estudos confirmaram a relação entre a infeção pelo VIH, doença disseminada e tuberculose extrapulmonar, isto é, a doença disseminada está relacionada a

imunossupressão que pode ser justificado pela co-infecção pelo VIH e pode levar a uma reativação da infeção em pacientes com histórico de tuberculose, e esta por sua vez desencadeia a tuberculose extrapulmonar (Control, Institutes and Society, 2013; Sanches, Carvalho and Duarte, 2014).

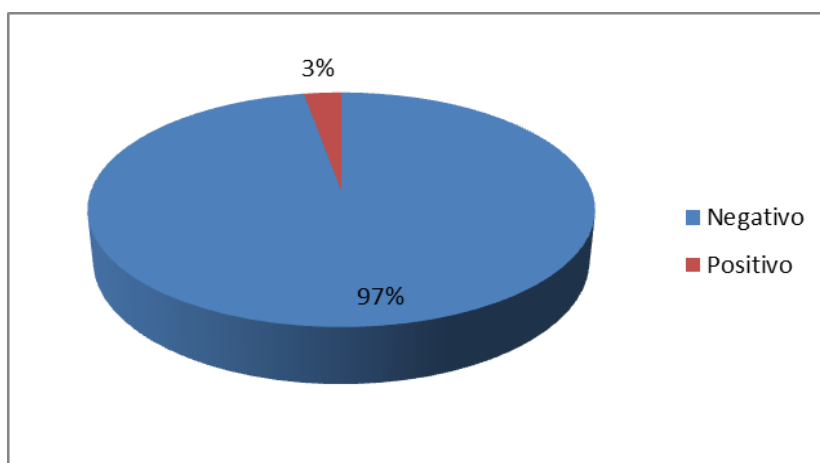


Figura 15. Proporção de casos de infeção VIH nos doentes com TB, no período de 2008 a 2013.

4.2. Prevalência de MTC por sexo e idade

Ao analisar a Figura 16, verifica-se que 68% dos doentes infectados são do sexo masculino e 32% são do sexo feminino. Ao comparar os dados analisados pelo CHBV com os dados notificados ao Sistema de Vigilância da Tuberculose da Direção-Geral da Saúde (DGS), verificamos que desde sempre o sexo masculino é mais suscetível à infeção por MTC (Duarte and Diniz, 2013; Macedo *et al.*, 2013). A diferença entre homens e mulheres pode refletir diferenças epidemiológicas como as diferenças de exposição, o risco de infeção ou ainda a progressão da infeção para doença (WHO, 2014). Normalmente os fatores de risco associados a infeção por MTC, como por exemplo, o consumo abusivo de álcool, drogas, infeção com VIH, entre outros estão mais frequentes no género masculino.

O presente trabalho aborda uma das principais patologias que afeta todas as faixas etárias de uma população. Observou-se que os doentes estudados tinham idades compreendidas entre os 9 e os 89 anos, mas a maior parte dos doentes infetados pertence ao grupo etário dos 19 aos 50 anos e verificou-se uma ínfima percentagem de tuberculose

nos doentes com menos de 18 anos (8%), apesar das crianças e dos idosos serem considerados os grupos fisiologicamente mais vulneráveis em termos de infeções.

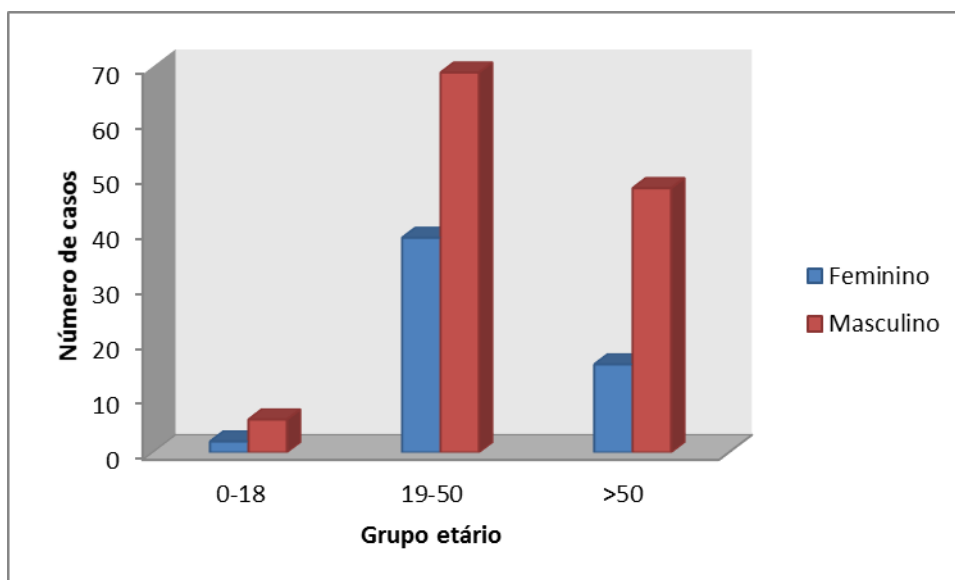


Figura 16. Número de casos de tuberculose por idade e género, no período de 2008 a 2013.

4.3. Prevalência de MTC por produtos biológicos

Na Figura 17, estão representados os dados referentes a requisição de diversos produtos biológicos para pesquisa de MTC, como expetorações, aspirado brônquico, pús, urina e líquidos pleural e ascítico. Do universo dos infectados com TB, 139 (75.5 %) correspondem a secreções brônquicas (expetorações e aspirado brônquico) e 45 (24.5%) correspondem nomeadamente a: suco gástrico, líquido pleural, líquido ascítico, biópsia pleural e pús. Ao analisar os dados conclui-se que 75.5% dos doentes infetados apresentaram tuberculose pulmonar e os restantes apresentaram tuberculose extrapulmonar (Fauci *et al.*, 2008).

De acordo com um estudo realizado por Houston e seus colaboradores, a pleura é um local mais acometido do que o tracto gastrointestinal (Houston and Macallan, 2014). Tal facto também se verifica no CHBV, tendo a tuberculose pleural 15% dos casos e a tuberculose do trato gastrointestinal 6% dos casos de tuberculose extrapulmonar.

Estudos mostram que a expetoração é o produto biológico mais analisado, o que indica que a tuberculose pulmonar (TP) é a predominante. No entanto, o diagnóstico da

tuberculose extrapulmonar (TBEP) é desafiador e muitas vezes é tardio, pois as suas manifestações clínicas dependem da localização da doença e é semelhante a muitas outras doenças (Abdallah *et al.*, 2011; Houston and Macallan, 2014). Além disso, a maioria das manifestações da tuberculose extrapulmonar não contribuem para a transmissão da infecção, tornando-o menos preocupante do que a tuberculose pulmonar, apesar da tuberculose extrapulmonar contribuir significativamente para morbidade, complicações, sequelas e incapacidades ao longo da vida (Sanches, Carvalho and Duarte, 2014). Contudo os clínicos devem estar cientes dos fatores de risco associados a TBEP, uma vez que o diagnóstico atempado é crucial para minimizar a morbidade e mortalidade dos doentes. Diversos estudos demonstram uma relação entre o sexo feminino e idade como fatores de risco para TBEP e alcoolismo e o sexo masculino como factores de risco para TP, o que faz todo sentido para a diferença da prevalência observadas no CHBV e em demais estudos notificados ao SVIG-TB (García-Rodríguez *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Sanches, Carvalho and Duarte, 2014).

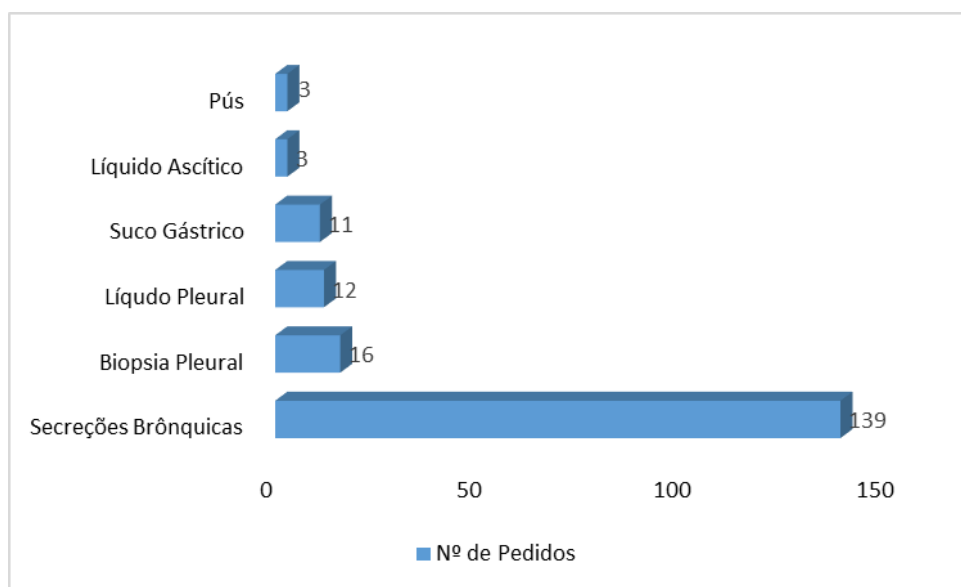


Figura 17. Número de casos de tuberculose por tipo de produto biológico, no período de 2008 a 2013.

4.4. Prevalência de MTC por serviço

A tuberculose é uma doença que pode afetar vários órgãos e com sintomas inespecíficos, portanto os doentes infetados podem ser observados inicialmente por diferentes especialistas até obter um diagnóstico definitivo da doença. Também a obtenção de amostras de produtos biológicos para a realização de exames microbiológicos constituem um outro obstáculo, e muitas vezes, é necessário realizar cirurgia (Sanches, Carvalho and Duarte, 2014).

Ao analisar a Figura 18, pode-se constatar que os serviços onde são tipicamente acolhidos os doentes com sintomas e sinais típicos da TB, são os que tiveram um maior número de pedidos para pesquisa de MTC com diagnóstico positivo para TB, nomeadamente a Pneumologia com 78 (44%) casos, Infeciologia com 74 (41%) casos e Medicina com 21 (12%) casos.

Pois, os doentes com suspeitas de tuberculose ou infectados com TB, geralmente são internados no serviço de Infeciologia ou da Pneumologia, onde são adotadas medidas preventivas de isolamento para os doentes contagiosos e tratamento, conforme a gravidade da doença e mau estado geral do doente, até passarem pela fase não contagiosa. Após a alta hospitalar os doentes são encaminhados para o Centro de Diagnóstico Pneumológico (CDP), onde recebem o acompanhamento e contínuo tratamento. Este centro juntamente com o Centro de Referência Nacional para Tuberculose Multiresistente, foi criado pela DGS em Junho de 2007, com a finalidade de poder controlar a resistência em doentes de cada região de Portugal (ARS Norte, 2009). No CDP, os doentes são tratados em regime de DOT, tal como descrito no capítulo sobre o tratamento da tuberculose.

Em relação aos restantes serviços, nota-se que o número de pedido é pouco significativo, pois alguns sintomas que não são específicos da tuberculose como por exemplo, a anorexia, mal estar-geral, fraqueza, perda de peso, febre, suores nocturnos e tosse remetem para despiste de outras doenças (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Em 2011, houve um caso novo de TB, em que o doente recusou o tratamento, mesmo, tendo sido explicado os riscos que corria. Trata-se de um doente idoso de 75 anos de idade, que teve contacto com uma pessoa infectada com TB. Apesar, desta ocorrência

ser incomum nos doentes diagnosticados no CHBV, mostra que é necessário divulgar informações sobre os riscos que esta doença constitui tanto para a saúde do próprio doente como para a comunidade e adotar medidas que aumentam a adesão ao tratamento, principalmente junto a população idosa.

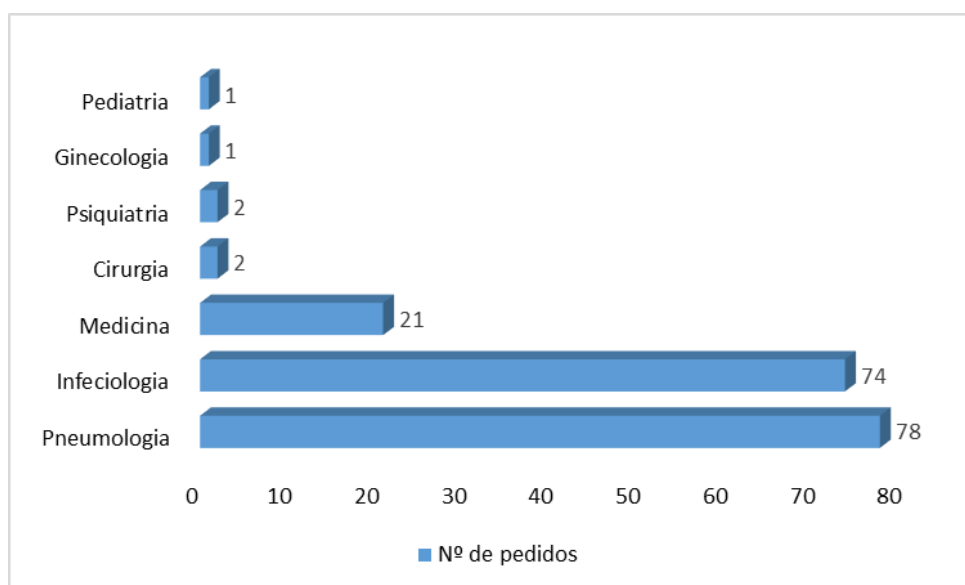


Figura 18. Distribuição do número de pedidos por serviço requisitante, no período de 2008 a 2013.

4.5. Prevalência de resistências aos anti bacilares

Para garantir o sucesso do tratamento, todas as amostras com cultura positiva devem ser submetidas ao teste de suscetibilidade aos anti bacilares de 1ª linha e caso apresentarem multirresistência devem ser testados para os anti bacilares de 2ª linha. A resistência aos anti bacilares está a aumentar em todo o mundo. A tuberculose multirresistente está evidente em mais de 100 países, sendo os anti bacilares de 2ª linha, as que mais preocupações geram, visto que estes são muito mais caros que os anti bacilares da 1ª linha e o aumento do custo do tratamento, constitui um importante fator no que toca a adesão ao tratamento, aumentando o risco de doença progressiva e a consequente morte. A implementação da estratégia DOTS, veio colmatar alguns obstáculos para o início do tratamento precoce e controlo da tuberculose, em doentes que se encontram socio economicamente desfavorecidos e/ou com falta de vontade em aderir aos cuidados de saúde (Bates *et al.*, 2004).

Durante o período de estudo foram analisados os perfis de suscetibilidade à rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (EMB), pirazinamida (PZA) e estreptomicina (STR) de 180 doentes com isolados de MTC. Do universo total dos doentes infetados, 29 apresentaram resistência, correspondendo a 47 resistências aos anti bacilares testados, como se pode observar na Figura 19, sendo as resistências mais frequentes a estreptomicina e a isoniazida, com 26 e 19 respetivamente.

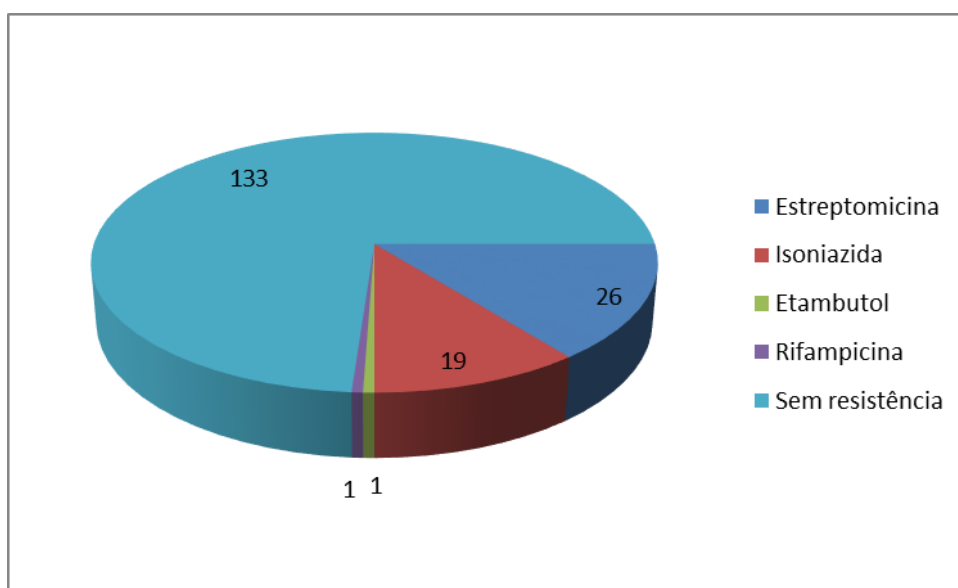


Figura 19. Percentagens de suscetibilidade dos isolados de MTC aos anti bacilares nos doentes com tuberculose, no período de 2008 a 2013.

Analisando a Figura 20, observou-se uma tendência decrescente da prevalência de resistência, no período de 2008 a 2010, no entanto em 2011 sofre um aumento significativo e de seguida tende para diminuir até 2013. Este facto deve-se a reestruturação do CHBV em 2011 com um maior número de doentes neste ano.

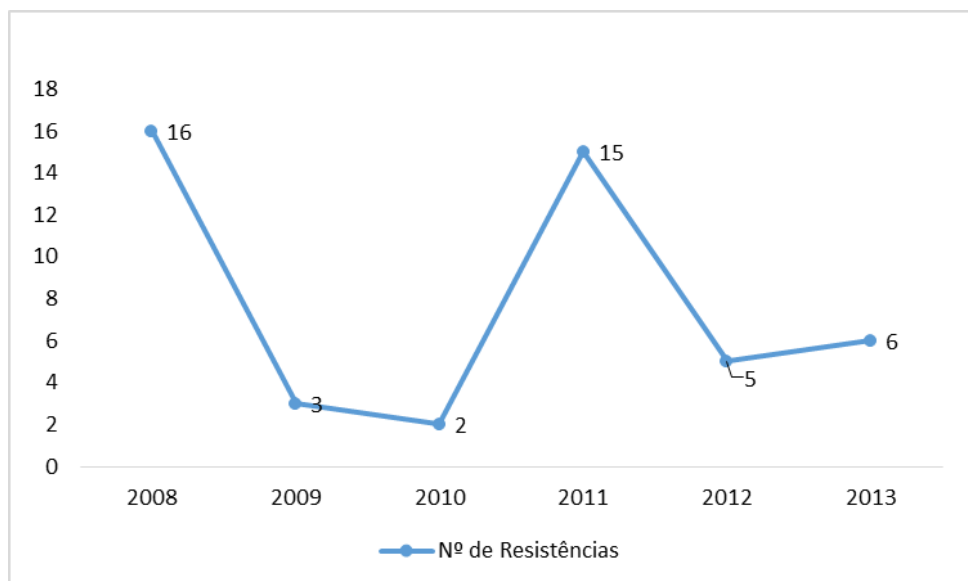


Figura 20. Evolução da prevalência de resistências, no período de 2008 a 2013.

Como demonstra a Figura 21, ao longo dos anos de estudo, predomina a resistência à STR com exceção de 2009 e 2010, em que na primeira é ultrapassado pela INH e na segunda tanto a INH como a STR mantem com a mesma frequência.

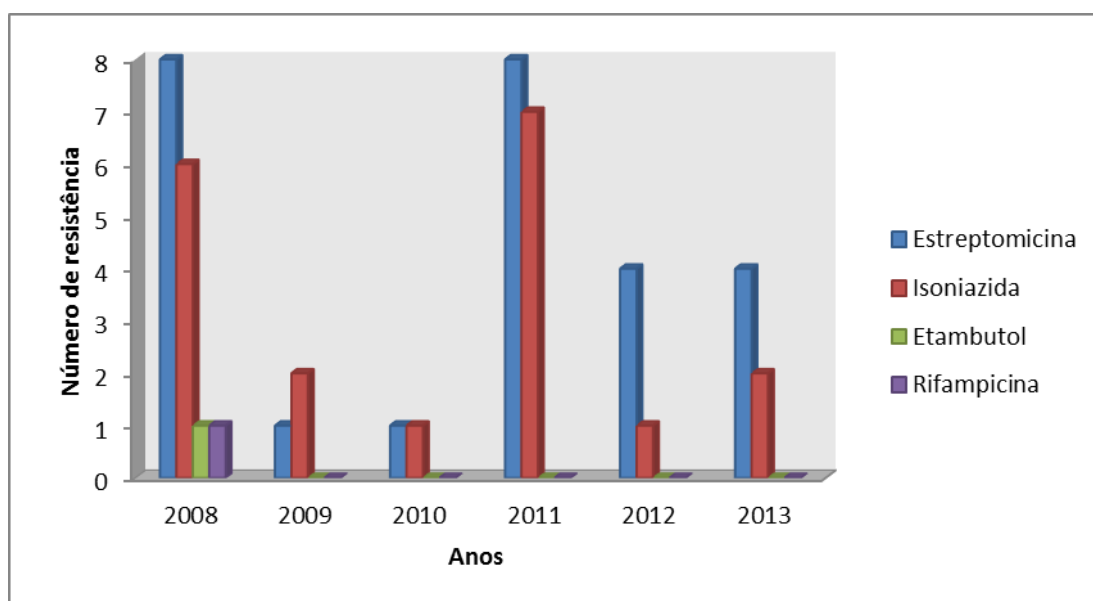


Figura 21. Prevalência da resistência dos isolados de MTC aos anti bacilares testados, no período de 2008 a 2013.

Através da análise da Figura 22, verifica-se que nos seis anos de estudo a multirresistência predomina em relação a monorresistência com exceção aos anos de 2009 e 2012.

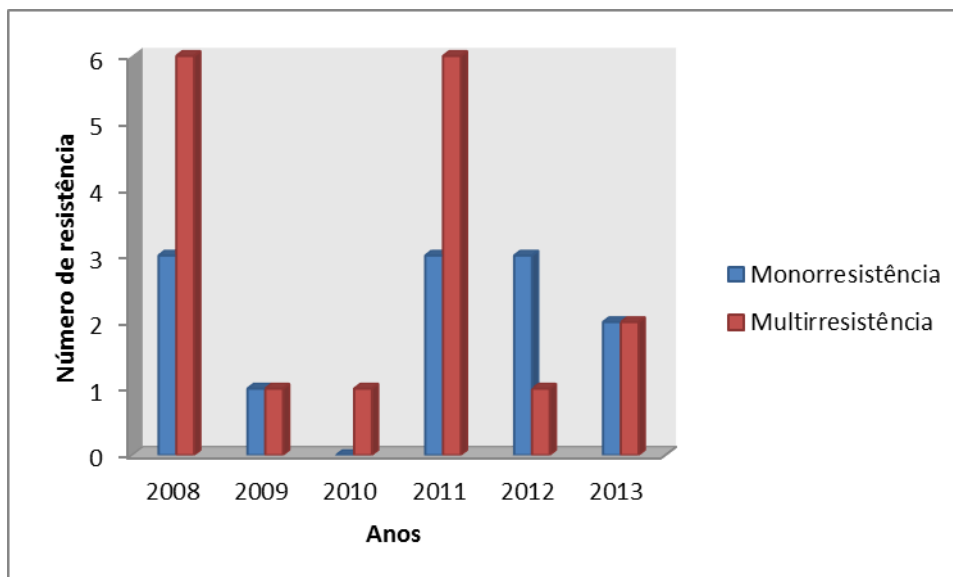


Figura 22. Prevalência da monorresistência e multirresistência aos anti bacilares.

Entretanto ao analisar a Figura 23 que demonstra o perfil de suscetibilidade das amostras de todos os doentes diagnosticados com tuberculose, nota-se que a monorresistência mais frequente foi a STR, correspondendo a 9 do total dos doentes resistentes aos anti bacilares testados. A multirresistência mais frequente foi a STR+INH, correspondendo a 16 do total dos doentes resistentes aos anti bacilares testados. Aumentar o acesso aos medicamentos anti bacilares tem sido fundamental para o tratamento da tuberculose multirresistente, mas este pode levar ao aumento de resistência a estes mesmos medicamentos. No entanto esta situação não se observou nos doentes atendidos no CHBV.

Atualmente a aquisição e a posterior transmissão de TB resistente aos anti bacilares esta a tornar-se cada vez mais num problema mundial e são reconhecida como uma ameaça ao controle da tuberculose e a TB-MR é considerada entre as principais ameaças emergentes (Cohen *et al.*, 2014)

Segundo Atun e os seus colaboradores será necessário implementar novas medidas para disponibilizar os dados, métodos e modelos utilizados na saúde pública de forma a

garantir a transparência, intensificar o controlo e criar responsabilidade na saúde pública (Atun, 2014).

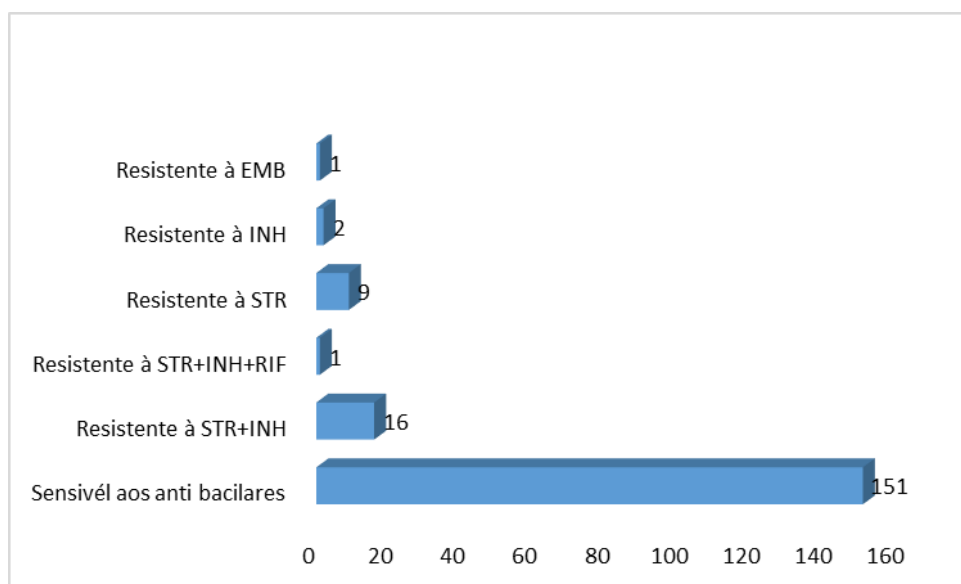


Figura 23. Perfis de suscetibilidade dos isolados MTC de todos os doentes, no período de 2008 a 2013.

5. CONCLUSÃO

Apesar dos progressos científicos a nível do diagnóstico e do tratamento, a tuberculose continua a ser um problema de saúde pública tanto em Aveiro como no resto de Portugal e do Mundo.

As áreas prioritárias de intervenção para o controlo da tuberculose são essencialmente a nível do diagnóstico precoce da infeção, ações de educação/sensibilização para a saúde pública, e intensificar a informação e formação profissional.

Ao longo dos últimos seis anos de estudo assistiu-se a uma oscilação da prevalência da tuberculose no CHBV, tendo-se registado um decréscimo em 2010 em relação a 2008, um ligeiro aumento em 2011 seguido de uma redução em 2012 e, novamente, registou-se um aumento da prevalência em 2013. Perante este facto, conclui-se que ainda há muito para intervir de forma a executar com eficiência os planos do Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, nesta região, pois deveria haver uma evolução positiva no decréscimo da incidência da TB, ao longo destes anos.

Os resultados obtidos neste estudo, tal como esperado, mostraram que a tuberculose é mais frequente nos homens do que nas mulheres, independentemente do grupo etário, sendo que os adultos jovens são os mais afetados.

Constatou-se que a tuberculose pulmonar (75.5%) predomina, comparando com a tuberculose extrapulmonar, o que aumenta a probabilidade de propagação da doença na comunidade, devido ao facto da tuberculose pulmonar ser de fácil contágio. Desta forma deve-se apelar para reforçar as medidas de prevenção e controlo da mesma.

O serviço que mais requisitou a pesquisa de MTC e com resultado positivo foi o serviço de Pneumologia, logo seguido de Infeciologia e por fim a Medicina, nos outros restantes serviços o número de casos positivos não foi significativo. Pelo facto do serviço de Pneumologia e de Infeciologia serem os locais próprios para acomodação e tratamento de doentes que apresentam manifestações clínicas típicas da TB.

A proporção de casos detetados em doentes com infeção por VIH é muito baixa (3%), tornando a co-infeção por VIH um fator de risco não muito preocupante, nesta região. Relativamente aos outros fatores de risco analisados, deve-se dar especial atenção,

a dependência de tabaco e álcool e a presença de diabetes mellitus, pois para além dos estudos feitos pelo CDC, neste estudo confirmou-se que são os fatores de risco mais relacionados com o desenvolvimento da tuberculose ativa.

A tuberculose está a tornar-se cada vez mais imprevisível, por causa das estirpes resistentes e multirresistentes. Posto isto conclui-se que é preciso investir ainda mais na promoção da ciência de forma a obter terapias mais eficazes, seguras e com menos efeitos secundários, a fim de controlar este problema de saúde pública, e continuar a apostar na divulgação e implementação da estratégia DOTS.

Em suma, pode-se dizer que a realização deste estudo permitiu ter conhecimentos da prevalência do MTC e do seu perfil de susceptibilidade, sendo estes conhecimentos de extrema importância principalmente a nível clínico, permitindo a elaboração de terapêuticas mais adequadas a população abrangida por este centro hospitalar, que será importante para uma atuação mais rápida e adequada.

Também é de salientar que a minha formação académica assim como a realização do estágio no CHBV contribuíram para um bom desempenho nas diversas atividades realizadas durante este estudo e onde pude desenvolver competências técnicas, tanto a nível do diagnóstico como a nível da análise dos dados. A autonomia e o espírito de trabalho em equipa que adquiri durante a formação académica foram relevantes durante o período de estágio (BioMérieux, 2008).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, A. M., 2008. Protein Secretion and Virulence in Pathogenic Mycobacteria, pp.19-24
- Abdallah, A. M. N. C. G. van P., Champion, P. A. D., Jeffery Cox, J. L., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & J., B., 2007. Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*, 5, pp.883–891.
- Abdallah, M., Larbi, T., Hamzaoui, S., Mezlini, E., Harmel, A., Ennafaa, M., Khalfallah, N., 2011. Abdominal tuberculosis: a retrospective series of 90 cases. *La Revue de médecine interne / fondée par la Société nationale française de médecine interne*, 32(4), pp.212–217.
- Almeida Da Silva, P.E.A. & Palomino, J.C., 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(7), pp.1417–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558086> [Accessed March 19, 2014].
- American Thoracic Society, 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161, pp.1376–1395. Available at: www.cdc.gov/tb/publications/pdf/1376.pdf [Accessed March 19, 2014].
- Anon, 2012. Microbial Sciences Initiative. Available at: http://www.msi.harvard.edu/news/news_2012_01.html [Accessed March 19, 2014].
- Aroonsri, A., Kitani, S., Choi, S.-U., & Nihira, T., 2008. Isolation and characterization of bamA genes, homologues of the gamma-butyrolactone autoregulator-receptor gene in Amycolatopsis mediterranei, a rifamycin producer. *Biotechnology letters*, 30(11), pp.2019–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18612594> [Accessed April 14, 2014].
- ARS Norte, 2009. *Centro de referência regional para a tuberculose multirresistente*, Lisboa. Available at: http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Conte%C3%BAdos/GRP/Tuberculose/Ficheiros/Centro_Referencia_Regional_Tuberculose_Multiresistente_T.pdf [Accessed April 14, 2014].
- Atun, R., 2014. Time for a revolution in reporting of global health data. *Lancet*, 384(9947), pp.937–938.
- Bates, I., Fenton, C., Gruber, J., Lalloo, D., Lara, A. M., Squire, S. B., Tolhurst, R., 2004. Vulnerability to malaria, tuberculosis, and HIV/AIDS infection and disease. Part II: Determinants operating at environmental and institutional level. *The Lancet. Infectious diseases*, 4(6), pp.368–75.

- Bento, J. et al., 2011. Métodos diagnósticos em tuberculose, 24, pp.145–154. Available at: www.actamedicaportuguesa.com [Accessed April 14, 2014]
- BioMérieux, 2008. *BacT/ALERT MB*, Durham, pp.2.
- BioMérieux, 2003. Manual de Meios de Cultura e Suplementos, pp.35.
- BioMérieux, 2014. Meios de Cultura Convencionais, pp.1. Available at: http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_217&pubparams.sform=5&lang=pt [Accessed March 3, 2014].
- Brennan, P., 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1-3), pp.91–97. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979202000896> [Accessed March 20, 2014].
- Calderon, V. E., Valbuena, G., Goetz, Y., Judy, B. M., Huante, M. B., Sutjita, P., Endsley, J., 2013. A Humanized mouse model of tuberculosis. *PloS one*, 8(5), p.e63331. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3656943&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 19, 2014].
- Care, C., 2014. *Guide for HIV/AIDS Clinical Care* 2014th. M. Rockville, ed.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2013. *Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know* 6th ed., Available at: www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/corecurr_all.pdf [Accessed March 19, 2014].
- Centers for Diseases Controls and Prevention, 2013. Tuberculosis (TB) - Data and statistics. Available at: <http://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm> [Accessed November 19, 2013].
- Centro Hospitalar Baixo Vouga -E.P.E., 2013. Regulamento Interno do Centro Hospitalar Do Baixo Vouga. Available at: <http://www.hip.min-saude.pt/Documents/RegInternoCHBV.pdf> [Accessed October 25, 2013].
- Cohen, T., Jenkins, H. E., Lu, C., McLaughlin, M., Floyd, K., & Zignol, M. et al., 2014. On the spread and control of MDR-TB epidemics: an examination of trends in anti-tuberculosis drug resistance surveillance data. *Drug Resistance Updates*.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Burdick, E., Fineberg, H. V., & Mosteller, F., 1994. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis. *JAMA*, 271(9), pp.698–702.
- Coll, P., 2009. Active drugs against Mycobacterium tuberculosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(8), pp.474–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766360> [Accessed March 28, 2014].

- Control, D., Institutes, N. & Society, I.D., 2013. *Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults*, Available at: http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf [Accessed March 28, 2014].
- Correia, A.M., Valente, P. & Duarte, R., 2013. *Planeamento do Rastreio de Contactos de Doentes com Tuberculose*, pp.3-15.
- Dawson, D., 2000. *Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy in Low Income Countries*, Paris, pp.2-15.
- Delgado, A. P. da C., Carvalho, I. A. de S., Duarte, I. M. dos S., & Andrade, V. L. G., 2013. *Relatório Estatístico 2012 M. da S. da R. de C. Verde*, ed., Praia, pp.43-47.
- Di Perri, G. & Bonora, S., 2004. Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(3), pp.593–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15282233> [Accessed April 14, 2014].
- Direção Geral da Saúde, 2008. Detecção Rápida da Tuberculose Multirresistente. *Circular Normativa*, pp.1–2. Available at: www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/tuberculose1/normas.aspx [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2007. Rastreio de infeção VIH nos doentes com tuberculose. *Circular Normativa Nº 19*. Available at: <http://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/tuberculose1/normas.aspx> [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2000. Resistência aos Antibióticos em Tuberculose. *Circular Normativa Nº 9*, (3), pp.1–3. Available at: www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/tuberculose1/normas.aspx [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2000. Sistema de Informação Intrínseco ao Programa de Tuberculose – Registo de Casos e Monitorização dos Resultados. *Circular Normativa Nº 8*. Available at: <http://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/tuberculose1/normas.aspx> [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2001. Sistema de Vigilância da Tuberculose (SVIG-TB) Substituição da Aplicação Informática e Suporte do Registo Clínico dos Casos. *Circular Normativa nº6*, pp.1–2. Available at: <http://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/tuberculose1/normas.aspx> [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2013. Sistema de Vigilância de Tuberculose (SVIG TB). Available at: <http://www.dgs.pt/prevencao-e-controlo-da-doenca/doencas-transmissiveis/areas-de-intervencao/tuberculose/sistema-de-vigilancia-de-tuberculose.aspx> [Accessed December 18, 2013].
- Direção Geral da Saúde, 2007. Testes de Sensibilidade aos Antituberculosos de 2ª Linha. *Circular Normativa Nº1*.

- Duarte, E.L., Paixão, E. & David, S., 2012. Bridging the gap between PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and tuberculosis diagnosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 16(3), pp.391–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230008> [Accessed December 18, 2013].
- Duarte, Duarte, R., Carvalho, a., Ferreira, D., Saleiro, S., Lima, R., Mota, M., Correia, A., 2010. Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 16(4), pp.559–572.
- Duarte, R. & Diniz, A., 2013. *Portugal Infecção VIH/SIDA e Tuberculose em Números - Programa Nacional para infecção VIH/SIDA*, Available at: <http://www.arscentro.min-saude.pt/Documents/informa%E7%F5es/Newsletter%20Final.pdf> [Accessed December 23, 2013].
- Duarte, R. & Diniz, A., 2013. *Programa Nacional de Luta Contra Tuberculose*, Available at: [http://www.arscentro.min-saude.pt/Documents/informações/Newsletter Final.pdf](http://www.arscentro.min-saude.pt/Documents/informações/Newsletter%20Final.pdf) [Accessed December 23, 2013].
- Essa, S. A., Abdel-Samea, S. A.-R., Ismaeil, Y. M., & Mohammad, A. A., 2013. Comparative study between using Lowenstein Jensen and Bio-FM media in identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 62(2), pp.249–255. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0422763813001039> [Accessed May 4, 2014].
- European Lung Foundation, 2013. Tuberculose: La résistance a aussi ses tests de diagnostic rapides. Available at: http://www.santelog.com/news/allergies-pneumologie/tuberculose-3-tests-de-diagnostic-rapide-des-resistances-au-traitement_11052_lirelasuite.htm?fb_comment_id=fbc_513991732021029_3242840_536140283139507#f9b7621a4 [Accessed November 19, 2013].
- Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J., 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 17th, Boston.
- Federal Ministry of Health Ethiopia, 2008. *Tuberculosis, Leprosy and TB/HIV Prevention and Control Programme* 4th, pp.18-32.
- Ferreira, N., 2013. Humanos e tuberculose: uma relação com 70.000 anos ainda longe do fim. *Ciências*, pp.1. <http://www.publico.pt/ciencias/jornal/humanos-e-tuberculose-uma-relacao-com-70000-anos-ainda-longe-do-fim-27029045> [Accessed December 19, 2013].
- Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C.F. de, 2000. *Microbiologia - Vol. II*, Lidel, ed., Lisboa, pp. 85-98.
- Forbes, A.B., Sahm, F.D. & Weissfeld, S.A., 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* L. Wilson, ed., pp.25–27.

- Gandhi, N. R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H. S., Zignol, M., van Soolingen, D., Bayona, J., 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, 375(9728), pp.1830–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488523> [Accessed March 20, 2014].
- García-Rodríguez, J. F., Álvarez-Díaz, H., Lorenzo-García, M. V., Mariño-Callejo, A., Fernández-Rial, Á., & Sesma-Sánchez, P., 2011. Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), pp.502–509.
- Goodman, L.S. & Gilman, A., 2005. *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 10th, J. G. Hardman & L. E. Limbird, eds., Rio de Janeiro, pp.955- 966.
- Gravet, A., Souillard, N., Habermacher, J., Moser, A., Lohmann, C., Schmitt, F., & Delarbre, J.-M., 2011. Culture and susceptibility testing of mycobacteria with VersaTREK. *Pathologie-biologie*, 59(1), pp.32–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850229> [Accessed December 5, 2013].
- Houston, A. & Macallan, D.C., 2014. Extrapulmonary tuberculosis. *Medicine*, 42(1), pp.18–22.
- Huynh, K.K., Joshi, S. a & Brown, E.J., 2011. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Current opinion in immunology*, 23(4), pp.464–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726990> [Accessed April 5, 2014].
- Hwang, S. M., Lim, M. S., Hong, Y. J., Kim, T. S., Park, K. U., Song, J., Kim, E. C., 2013. Simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Tuberculosis*, 93(6), pp.642–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988279> [Accessed November 21, 2013].
- INSA, 2014. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: formação no INSA, IP. Available at: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/DiagLabTuberculose.aspx> [Accessed February 07, 2014].
- Iyer, V.N. et al., 2011. Bronchoscopy in suspected pulmonary TB with negative induced-sputum smear and MTD(®) Gen-probe testing. *Respiratory medicine*, 105(7), pp.1084–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420844> [Accessed March 24, 2014].
- Kelekçi, S., Karabel, M., Karabel, D., Hamidi, C., Hoşoğlu, S., Gürkan, M. F., & Taş, M. A., 2014. Bacillus Calmette-Guérin is a preventive factor in mortality of childhood tuberculous meningitis. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 21, pp.1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231588> [Accessed April 14, 2014].
- Khanna, M. & Solanki, R., 2012. Streptomyces antibioticalis, a Novel Species from a Sanitary Landfill Soil. *Indian journal of microbiology*, 52(4), pp.605–11. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3516647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 14, 2014].

- Khéchine, A. El & Drancourt, M., 2011. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in a microbiological laboratory. *Médecine et maladies infectieuses*, 41(10), pp.509–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917391> [Accessed March 23, 2014].
- Krishnan, N., Robertson, B.D. & Thwaites, G., 2010. The mechanisms and consequences of the extra-pulmonary dissemination of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 90(6), pp.361–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829117> [Accessed April 14, 2014].
- Lago, J., 2012. Diagnóstico Laboratorial de Microbactérias. In *Jornadas BioMérieux*. Lisboa-Portugal: BioMérieux, pp.5-19.
- Landscape, M., 2012. Review of HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria Landscape for the Global Fund Strategy 2012-2016, pp.1–23. Available at: <http://www.theglobalfund.org/en/about/strategy/> [Accessed April 13, 2014].
- Lemos, A.C.M. & Matos, E.D., 2013. Multidrug-resistant tuberculosis. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 17(2), pp.239–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23477764> [Accessed April 13, 2014].
- Lin, C. B. *et al.*, 2011. Is it appropriate to routinely use a nucleic acid amplification test for the diagnosis of tuberculosis? *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 27(4), pp.138–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463836> [Accessed April 25, 2014].
- Lin, C. Y. *et al.*, 2013. Effects of gender and age on development of concurrent extrapulmonary tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis: a population based study. *PloS one*, 8(5), p.e63936.
- Lumb, R., Deun, A. Van, Bastian, I., & Fitz-Gerald, M., 2013. *Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy*, pp.8.
- Macedo, R. *et al.*, 2012. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Lisbon and Vale do Tejo, Portugal, from 2008 to 2010. *International Journal of Mycobacteriology*, 1(3), pp.131–136.
- Macedo, R., Silva, A. S., Rodrigues, I. J., Rodrigues, I., Furtado, C., & Simões, M. J., 2013. *Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal* INSA,IP., Lisboa, pp.52
- Macedo, R., Silva, A. S., Rodrigues, I. J., Rodrigues, I., Furtado, C., & Simões, M. J., 2013. *Vigilância Laboratorial da Tuberculose em Portugal: relatório 2012*, INSA,IP., Lisboa, pp.7-48.

- Machado, D., Ramos, J., Couto, I., Cadir, N., Narciso, I., Coelho, E., Viveiros, M., 2014. Assessment of the BD MGIT TBc identification test for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex in a network of mycobacteriology laboratories. *BioMed research international*, 2014, p.398108.
- Mendão, L. & Freitas, R., 2011. *VIH & Tuberculose*, Lisboa-Portugal: Grupo Português de Activistas, pp.1-20.
- Ministério da Saúde, 2014. Despacho n.º 5681-A/2014. In *Diário da República 2.ª Série*. Diário da República, pp. 2–20.
- Munawwar, A. & Singh, S., 2012. AIDS associated tuberculosis: a catastrophic collision to evade the host immune system. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 92(5), pp.384–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795795> [Accessed April 14, 2014].
- Murray, C. J. L., Ortblad, K. F., Guinovart, C., Lim, S. S., Wolock, T. M., Roberts, D. A., Vos, T., 2014. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(14), pp.1005–1070.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A., 2007. *Manual of Clinical Microbiology* 9th ed., pp.543-550.
- Nicol, M.P. & Zar, H.J., 2011. New specimens and laboratory diagnostics for childhood pulmonary TB: progress and prospects. *Paediatric respiratory reviews*, 12(1), pp.16–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 25, 2014].
- Noertjojo, K., Tam, C. M., Chan, S. L., & Chan-Yeung, M. M. W., 2002. Extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis in Hong Kong. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 6(10), pp.879–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365574> [Accessed April 25, 2014]
- Nunn, P., Reid, A. & De Cock, K.M., 2007. Tuberculosis and HIV infection: the global setting. *The Journal of infectious diseases*, 196 Suppl (Suppl 1), pp.S5–14.
- Organização Pan-Americana de Saúde, 2014. Dia Mundial da Tuberculose 2014 tem como slogan “Alcance os três milhões.”, pp.1. Available at: http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=233:dia-mundial-da-tuberculose-2014-tem-como-slogan-qalcance-os-tres-milhoesq&Itemid=0&lang=pt [Accessed July 20, 2014]
- Palomino, J.C., Leão, S.C. & Ritacco, V., 2007. *Tuberculosis 2007* 1st ed., pp.93-107.

- Pascope, L., Franks, J., Marks, S. M., Salcedo, K., Schmitz, K., Colson, P. W., Sayles, J., 2014. Opportunities for tuberculosis diagnosis and prevention among persons living with HIV: a cross-sectional study of policies and practices at four large Ryan White Program-Funded HIV clinics. *PloS one*, 9(7), p.e101313.
- Perdigão, J., Macedo, R., Silva, C., Machado, D., Couto, I., Viveiros, M., Portugal, I. 2013, From multidrug-resistant to extensively drug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: the stepwise mode of resistance acquisition. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(1), pp.27–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054995> [Accessed April 13, 2014].
- Pina, E.R. de, 2013. *Adesão dos Pacientes com Tuberculose ao Tratamento com Anti-tuberculosos na Cidade da Praia e São Felipe- Fogo - Factores da não Adesão ao Tratamento*. Universidade Jean Piaget de Cabo Verde.
- Pinto, M. V., Aguiar, T., Nogueira, R., Dias, A. C., & Rosso, A. L., 2014. Hemichorea in tuberculous meningitis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 72(3), pp.254–254. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2014000300254&lng=en&nrm=iso&tlng=en [Accessed April 14, 2014].
- Ramos J. M., Pérez-Butragueño, M., Tisiano, G., Yohannes, T., Reyes, F., & Górgolas, M., 2013. Evaluation of Ziehl–Neelsen smear for diagnosis of pulmonary tuberculosis in childhood in a rural hospital in Ethiopia. *International Journal of Mycobacteriology*, 2(3), pp.171–173. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212553113000344> [Accessed April 24, 2014].
- Raviglione, M.C., 2010. *Tuberculosis* 4th ed. Claude Lenfant, ed., London: Informat Healthcare, pp.60-75.
- Ravishankar, A. R., Deepthi, C., Saileela, K., Ramadevi, V., & Srikanth, 2013. Improved Sensitivity of Diret Microscopy for Acid Fast Bacilli: Sedimentation as an Alternative to Centrifugation for concentration of tubercle Bacilli. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3(4), pp.153–158.
- Von Reyn, C.F. & Vuola, J.M., 2002. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(4), pp.465–74.
- Sanches, I., Carvalho, A. & Duarte, R., 2014. Who are the patients with extrapulmonary tuberculosis? *Revista portuguesa de pneumologia*, (xx), pp.4–7.
- Santos, A.F.C.P., 2010. *O combate à tuberculose: Uma abordagem demográfico - Epidemiológica; o hospital de repouso de Lisboa (1882-1975)*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Letras, Departamento de Hisória.
- Santos, L.C., 2012. Review: The Molecular Basis of Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Medical Microbiology*, 2012(March), pp.24–36.

- Sc, J.B.W.B. & D, M.A.W.P., 2002. Isoniazid , The Frontline of Resistance in Mycobacterium tuberculosis, 6, pp.114–123.
- Shinu, P. et al., 2012. Evaluation of two pretreatment methods for the detection of Mycobacterium tuberculosis in suspected pulmonary tuberculosis. *Journal of basic microbiology*, 53(3), pp.260–267. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733571> [Accessed May 4, 2014].
- Sonnenberg, P., Glynn, J. R., Fielding, K., Murray, J., Godfrey-Faussett, P., & Shearer, S., 2004. HIV and pulmonary tuberculosis: the impact goes beyond those infected with HIV. *AIDS (London, England)*, 18(4), pp.657–62.
- United Nations, 2013. News on Millennium Development Goals. Available at: <http://www.un.org/millenniumgoals/> [Accessed February 05, 2014].
- United Nations Department, 2013. Combat HIV / AIDS , malaria and other diseases, pp.2012–2013. Available at: <http://www.un.org/millenniumgoals/> [Accessed February 05, 2014].
- Valcheva, V. & Mokrousov, I., 2011. Drug-Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Basis and Genotypic Detection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(4), pp.18–23. Available at: http://diagnosisp.com/dp/journals/view_article.php?journal_id=1&archive=0&issue_id=35&article_id=1213 [Accessed April 14, 2014].
- Velayati, A.A. & Farnia, P., 2012. Division-cycle in Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, 1(3), pp.111–117. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212553112000738> [Accessed April 13, 2014].
- WHO, 2014. Tuberculosis and gender. Available at: http://www.who.int/tb/challenges/gender/page_1/en/ [Accessed July 11, 2014].
- World Health Organization, 2013. *Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision*, Geneva. pp.46.
- World Health Organization, 2008. *Global tuberculosis report 2013*, Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> [Accessed December 21, 2013].
- World Health Organization, 2013. Tuberculosis. *WHO Media centre*, p.1. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html> [Accessed December 20, 2013].
- World Health Organization, 2012. Tuberculosis, p.1. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [Accessed November 19, 2013].

Anexo I: Procedimientos

A. MYCOPREP-Descontaminação/homogeneização

1. Num tubo de centrífuga de 50 ml, com tampa de enroscar, colocar a amostra (máximo de 10 ml) e adicionar igual quantidade de NaCl-NaOH (Mycoprep);
 - 75 ml Mycoprep -15 expetorações (5 ml em cada homogeneização)
2. Enroscar a tampa do tubo e agitar no vortex até a amostra ficar líquida (15-20 segundos);
3. Deixar 15 minutos à temperatura ambiente;
4. Adicionar água destilada esterilizada até a marca de 50 ml do tubo e agitar;
5. Centrifugar 15 minutos a 3000 rpm (2200-2500 g);
6. Rejeitar o sobrenadante;
7. Ressuspender o sedimento com 1 ml de água destilada esterilizada;
8. Inocular em cada frasco VersaTREK 0,5 ml de amostra homogeneizada;
9. Inocular 0,5 ml de amostra homogeneizada em cada meio de *Lowenstein-Jensen*.

Inoculação do frasco para incubação no VersaTREK

1. Em cada frasco inocular 0,5 ml de PVNA (Mistura antibiótica de: Polymixina B, Vancomicina, Ácido Nalidixico e Anfoterina B)
 - a. Reconstituir o frasco de PVNA com 25 ml de água destilada esterilizada. Depois de reconstituído pode ser usado no intervalo de 5 dias ou congelado a 1-20 °C e usado num prazo de 3 meses. O reagente reconstituído é suficiente para 50 frascos VersaTREK

2. Em cada frasco inocular 1 ml de suplemento de crescimento (GS - Grow Supplement)
 - A. Os frascos de GS já vêm prontos a usar. Conservar entre 2-8 °C protegido da luz.
3. Em cada frasco inocular 0,5 ml de amostra homogeneizada.
4. Agitar no vortex cada frasco antes de incubar no VersaTREK.

B. Preparação dos anti bacilares

➤ Rifampicina

Adicionar 25 ml de água destilada estéril ao frasco da Rifamicina.

➤ Isoniazida

Adicionar 25 ml de água destilada estéril ao frasco da isoniazida;

Transferir 5 ml do antibiótico reidratado para um tubo contendo 15 ml de água destilada esterilizada.

➤ Etambutol

Adicionar 25 ml de água destilada estéril ao frasco da Etambutol;

Transferir 5 ml do antibiótico reidratado para um tubo contendo 6 ml de água destilada esterilizada.

➤ Estreptomicina

Adicionar 25 ml de água destilada estéril ao frasco da Estreptomicina;

Transferir 5 ml do antibiótico reidratado para um tubo contendo 15 ml de água destilada esterilizada.

➤ Pirazinamida

Adicionar 25 ml do tampão de reidratação do PZA.

C. Coloração de Ziehl - Neelsen

Procedimento:

- Fazer o exame direto e cobrir com fushina e flamejar até a emissão de vapor;
- Deixar atuar durante 5 minutos;
- Lavar suavemente com água;
- Cobrir com a mistura ácido-álcool;
- Deixar atuar durante 6 minutos;
- Lavar suavemente com água, secar;
- Visualizar com o auxílio do microscópio, usando a objetiva de imersão (100 vezes).

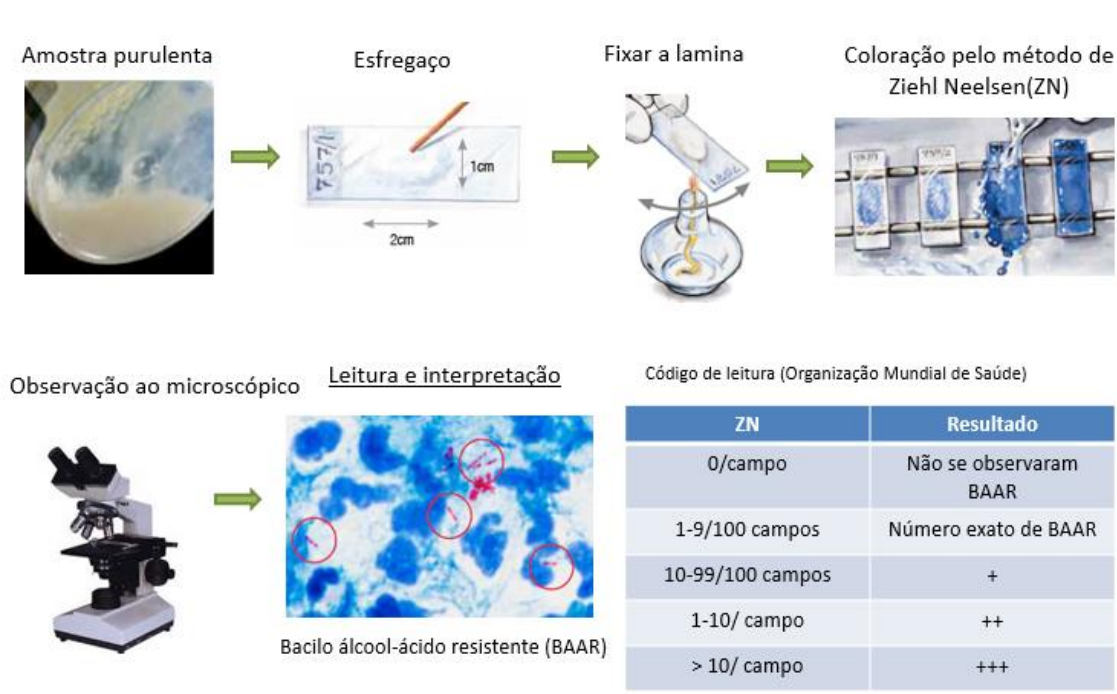


Figura 24. Representação esquemática do procedimento de baciloscopia (Lumb *et al.*, 2013).

Anexo II: Ficha de identificação

Centro Hospitalar do Baixo Vouga E.P.E.									
Identificação da amostra	Exame		Data						Resultado
	Ziehl inicial								
	PCR Inicial								
	Lowenstein	Cultura							
		Ziehl							
		PCR							
	VersaTREK	VersaTREK							
		Ziehl VersaTREK							
		PCR VersaTREK							
		Ziehl inicial							
PCR Inicial									
Lowenstein		Cultura							
		Ziehl							
		PCR							
VersaTREK		VersaTREK							
		Ziehl VersaTREK							
		PCR VersaTREK							
		Ziehl inicial							
	PCR Inicial								
	Lowenstein	Cultura							
		Ziehl							
		PCR							
	VersaTREK	VersaTREK							
		Ziehl VersaTREK							
		PCR VersaTREK							